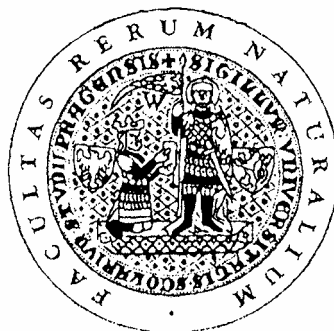


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



RNDr. Denisa Petráčková

**Využití gelově-založených proteomových technik při analýze
genové exprese u prokaryotních a eukaryotních modelů**

“Analysis of gene expression in prokaryotic and eukaryotic model organisms by
proteomic gel-based separation tools”

Dizertační práce

Vedoucí dizertační práce: RNDr. Jaroslav Weiser, CSc.

Konzultanti dizertační práce: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.,
Doc. RNDr. Petr Heřman, CSc. (MFF UK, Fyzikální ústav)

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.09.2011

Vzhledem k tomu, že práce obsahuje 3 nezávislé vědecké projekty, bude možná moje poděkování trochu obsáhlejší.

Nejprve bych chtěla poděkovat RNDr. Jaroslavu Weiserovi, CSc., pod jehož vedením jsem dizertační práci nakonec vypracovala. Za jeho cenné rady, všestrannou podporu a přátelskou atmosféru při tvorbě této práce.

Můj velký dík patří i paní docentce RNDr. J. Svobodové, CSc., pod jejímž vedením jsme mnoho let pracovala a úspěšně procházela jednotlivými kroky mého studia.

Rovněž děkuji svým konzultantům z Fyzikálního ústavu MFF UK, jmenovitě panu Doc. RNDr. P. Heřmanovi, Csc. a Doc. RNDr. J. Večeřovi, CSc., za možnost detailního měření fluidity membrány za pomoci jejich vybavení.

Můj nemalý dík patří RNDr. Jiřímu Janečkovi, CSc. za cennou pomoc při experimentálních měřeních a následných konzultacích.

Za příjemné začátky s dvojrozměrnou elektroforézou bych moc rada poděkovala celému týmu pana Doc. Petra Svobody, DrSc., zvláště Petru Matouškovi.

Děkuji také Ing. Silvii Bezouškové za technickou pomoc při standardizovaných separacích bílkovin pomocí 2-D elektroforézy.

Můj nemalý dík patří také všem mým kolegům v laboratořích, kterými jsem během studia prošla.

Závěrem bych ráda poděkovala celé své rodině, která mě všestranně podporovala a poskytla mi potřebné zázemí.

Tato práce vznikla s podporou grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (grant NR/9531 – 3, 2007-2009. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské akutní leukémie) a grantové agentury Akademie věd České Republiky (grant IAA500200913, 2009-2013. Adaptivní změny v proteomech populací k antibiotikům rezistentních bakterií *Escherichia coli* a *Mycobacterium smegmatis* během růstu v kontinuálních kultivačních systémech v přítomnosti subletálních koncentrací těchto antibiotik).

Abstrakt

Tato dizertační práce ukázala možnosti využití gelově-separační techniky 2-DE při řešení tří nezávislých vědeckých projektů. Proteomické studie vhodně doplnily výsledky získané i jinými přístupy a přispěly k celkovému zobrazení proteinové situace v daných biologických systémech.

Srovnáváním celkového proteomu *E. coli* bylo identifikováno 61 proteinových změn v souvislosti s vývojem bakteriální populace v přítomnosti antibiotika erytromycinu. Tento „klasický“ experiment zahrnoval vhodnou izolaci vzorku, separaci a analýzu bílkovin pomocí 2-DE s následnou identifikací proteinů pomocí MS. Nevýhodou bylo velké množství výsledných dat, které bylo potřeba zpracovat (počítačovou analýzou dat).

Naproti tomu v případě studia membránového proteomu *B. subtilis* při pH stresu bylo třeba primárně modifikovat metodu izolace membránových a s membránou asociovaných bílkovin pro jejich vhodnou separaci na 2-DE. Optimalizace zahrnovala především úpravy v použitých chemikáliích-detergentech podílejících se na solubilizaci proteinů a časové prodloužení tohoto procesu. Detegováno bylo následně 5 významných proteinových změn v odpovědi na pH stres týkajících se proteinů AcoB, SodA, YjcH, YwaC a YkwC. Data byla doplněna údaji o rigidizaci membrány *B. subtilis* v kyselém prostředí (stanoveno pomocí pulzní časově rozlišená fluorescenční spektroskopie).

V poslední části práce využití techniky „imunodeplece“ vedlo k částečnému odstranění 12 majoritních bílkovin ze vzorku kostní plazmy, což pomohlo vylepšit proteinový profil kostní plazmy dětí s diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a detegovat tak i minoritní proteiny ve vzorku jako potenciální *biomarkery* ALL.

Abstract

This PhD thesis showed the applicability of a gel-based proteomic separation tool, 2-D electrophoresis in three independent projects. Supplemented with results obtained using different techniques the proteomic studies enabled a global imaging of proteoms in the studied biological systems.

Comparing total proteoms of *E. coli* 61 protein changes were identified and connected with the development of the bacterial population in the presence of an antibiotic compound, erythromycin. This classic proteomic approach included sample extraction, optimization of its 2D separation followed by 2D gel analysis and protein identification by MS methods. A disadvantage of this work was an enormously large amount of data to be analyzed by computer analysis.

For the study of membrane proteom of *B. subtilis* during a pH induced stress, on the other hand, a modification of isolation techniques for membrane and membrane associated proteins was required first to improve the subsequent protein separation by 2-D electrophoresis. The optimalization of protein extraction included changes in detergents used for protein solubilization and a prolongation of time periods in the protein solubilization protocol. 5 relevant protein changes were then described that play a role in the bacterial response to pH stress. The proteins were identified as AcoB, SodA, YjcH, YwaC, and YkwC. The proteomic data were further combined with findings describing *B. subtilis* membrane rigidity under acidic conditions (data obtained using time-resolved fluorescence spectroscopy).

In the last project of this work, an imunodepletion technique was used to remove 12 majority proteins from the bone plasma samples and combined with 2-D protein separation. It led to an improved bone plasma protein image of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Simultaneously, minority proteins from the samples could be also analyzed for potential ALL biomarker determination.

Použité zkratek

1-D, 2-D	Jednorozměrná, dvojrozměrná
1-DE, 2-DE	Jednorozměrná, dvojrozměrná elektroforéza
AK	Aminokyselina
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
BCA	Bicinchronic Acid
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin (hovězí sérum albumin)
CA-IEF	Izoelektrická fokusace s použitím amfolytů (<u>C</u> arrier <u>A</u> mpholyte)
CBB	Barvení gelů pomocí <u>C</u> oomassie <u>B</u> rilliant <u>B</u> lue
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPH	1,6-difenyl-1,3,5 hexatrien
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ESI	Ionizace elektrosprejem (<u>E</u> lectrospray <u>I</u> onization)
GSPs	Globální stresové proteiny (<u>G</u> eneral <u>S</u> tress <u>P</u> roteins)
HPLC	Typ kapalinové chromatografie (<u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HUPO	<u>H</u> uman <u>P</u> roteome <u>O</u> rganization
CHAPS	3-[(3- <u>c</u> holamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonová kyselina
IAA	Jodacetamid
IEF	Izoelektrická fokusace
IPG	„Imobilizovaný“ (ukotvený) pH gradient (<u>I</u> mmobilized pH <u>G</u> radient)
KKP	Kontrolní kostní plazma
KP	Kostní plazma
LKP	Leukemická kostní plazma
MALDI-TOF	Desorpce a ionizace laserem v prostředí matrice (typ zdroje: <u>M</u> atrix- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption <u>I</u> onization, typ analyzátoru: <u>T</u> ime- <u>O</u> f- <u>F</u> light)

Met	Metionin
Mr	Relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie (<u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
MudPIT	Vícerozměrná technologie pro identifikaci proteinů (<u>M</u> ultidimensional <u>P</u> rotein <u>I</u> dentification <u>T</u> echnology)
NEpHGE	Nerovnovážná izoelektr. Fokusace (<u>N</u> onequilibrium <u>pH</u> gel elect.)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance)
O.D.	Optická denzita
ORF	Otevřený čtecí rámec
PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza
pI	Izoelektrický bod
PM	Membránové proteiny (<u>P</u> lasma <u>M</u> embrane)
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethylsulfonyl- <u>f</u> luorid
SDS	Dodecylsulfát sodný (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate)
SDS - PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v sodium-dodecylsulfátu
SSP	Číslo <i>spotu</i> , (<u>S</u> ample <u>S</u> pot <u>N</u> umber)
T	Doba zdvojení bakterií
TCA	Trichloroctová kyselina

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. Úvod do proteomiky	3
2.2. Metodické přístupy v proteomickém výzkumu	4
2.3. Dvojměrná elektroforéza proteinů	6
2.3.1. Příprava vzorku pro dvojměrnou elektroforézu	6
2.3.2. První rozměr: izoelektrická fokusace	8
2.3.3. Druhý rozměr: elektroforéza v přítomnosti SDS	9
2.3.4. Vizualizace: barvení 2-D gelů	9
2.3.5. Metody analýzy obrazu a obrazové databáze 2-D gelů	11
2.3.6. Limity 2-D elektroforézy	12
2.3.7. Další metody používané v proteomice	13
2.4. Hmotnostní spektrometrie	14
2.5. Dělení komplexních vzorků	16
2.5.1. Frakcionace krevní plazmy	16
2.5.1.1. Krevní plazma a plazmatické proteiny	17
2.5.1.2. Technika pro analýzu plazmy - dvojměrná elektroforéza	20
2.5.2. Izoelektrická frakcionace v proteomice	21
2.5.2.1. OFFGEL frakcionátor	21
2.5.2.2. BioRad Rotofor systém	22
2.5.2.3. ZOOM IEF frakcionátor	23
2.5.2.4. Digital ProteinChip (dPC)	24
2.6. Membránový proteom	25
2.6.1. Specifika cytoplazmatické membrány u bakterií	26
2.6.2. Metody separace membránových bílkovin a jejich purifikace	27
2.7. Proteomové projekty	29
2.7.1. Studium bakteriální membrány <i>B. subtilis</i> dl.vystaveného pH stresu	29
2.7.2. Srovnávací proteomová studie adaptace populace <i>E. coli</i>	31
2.7.2.1. Rezistence k antibiotikům	31
2.7.2.1.1. Rezistence k erytromycinu	32
2.7.2.2. Kultivační systémy	33
2.7.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie	34
2.7.3.1. Leukémie v dětském věku	35
2.7.3.2. Etiologie a patogeneze	35
2.7.3.3. Diagnóza	36
2.7.3.4. Léčba	37
2.7.3.5. Proteomický přístup při onemocněních krvetvorby	37
3. CÍLE PRÁCE	39
4. MATERIÁL A METODY	40
4.1. Biologický materiál	40
4.1.1. <i>Bacillus subtilis</i>	40
4.1.2. <i>Escherichia coli</i>	40
4.1.3. Kostní plazma	41
4.2. Kultivační půdy	41

4.2.1.	Šikmý agar pro uchování <i>B. subtilis</i>	41
4.2.2.	Komplexní kultivační medium pro růst <i>B. subtilis</i>	41
4.2.3.	Pufry	42
4.2.4.	Kultivační medium pro růst <i>E. coli</i> (M9)	42
4.3.	Technické zázemí	43
4.4.	Chemikálie	43
4.5.	Příprava vzorků	43
4.5.1.	Kultivace <i>B. subtilis</i> a <i>E. coli</i>	43
4.5.1.1.	Růstová křivka <i>Bacillus subtilis</i>	44
4.5.1.2.	Kontinuální kultivace bakterie <i>Escherichia coli</i>	44
4.5.2.	Zpracování vzorků kostní plazmy	47
4.6.	Izolační metody	48
4.6.1.	Izolace membránové frakce <i>B. subtilis</i>	48
4.6.2.	Izolace celkové bílkovinné frakce <i>E. coli</i>	49
4.6.3.	Příprava vzorku kostní plazmy pro 2-DE analýzu	49
4.6.3.1.	Odstranění majoritních bílkovin ze vzorku pomocí „imunodeplece“ ..	50
4.6.3.2.	Rozdělení vzorku pomocí „pre-fractionace“	50
4.7.	Stanovení koncentrace bílkovin	51
4.7.1.	Stanovení koncentrace bílkovin pomocí BCA	51
4.7.2.	Stanovení koncentrace bílkovin pomocí EZQ	52
4.8.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza	52
4.8.1.	Roztoky pro elektroforézu	53
4.8.2.	Jednorozměrná elektroforéza bílkovin (1-DE)	53
4.8.3.	Dvojitá rozměrná elektroforéza bílkovin (2-DE)	54
4.9.	Detekce bílkovin	55
4.9.1.	Detekce proteinů Coomassie Brilliant Blue R250	55
4.9.2.	Detekce proteinů koloidní Coomassie Blue	56
4.9.3.	Detekce proteinů stříbrem	56
4.9.4.	Fluorescenční barvení proteinů	56
4.9.5.	Detekce bílkovin pomocí inkorporace radioaktivního izotopu [³⁵ S]-Met... 57	
4.9.5.1.	Radioaktivní značení bílkovin – <i>B. subtilis</i>	58
4.9.5.2.	Radioaktivní značení bílkovin – <i>E. coli</i>	58
4.9.6.	Vyhodnocení gelů	59
4.9.7.	Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)... 59	
4.10.	Fluorescenční spektroskopie	60
4.10.1.	Anizotropie fluorescence sondy DPH	60
4.10.2.	Pulzní časově rozlišená fluorescenční spektroskopie	61
4.10.2.1.	Měření anizotropie fluorescence v časovém rozlišení	62
5.	VÝSLEDKY	63
5.1.	Studium bakteriální membrány <i>B. subtilis</i> vystaveného pH stresu	63
5.1.1.	Růstová charakteristika <i>B. subtilis</i> v závislosti na pH kultivace	63
5.1.2.	Analýza proteinů cytoplazmatické membrány <i>B. subtilis</i> pomocí 2-DE 65	
5.1.3.	Pulzní časově rozlišená fluorescenční spektroskopie sondy DPH	70
5.2.	Srovnávací proteomová studie adaptace populace <i>E. coli</i>	73
5.2.1.	Fyziologická charakteristika <i>E. coli</i> kontinuálně kultivované	73
5.2.2.	Analýza celkových proteinů <i>E. coli</i> pomocí 2-D elektroforézy	77

5.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie	89
5.3.1. „Imunodeplece“	90
5.3.1.1. Kostní plazma – celkový proteinový profil	90
5.3.1.2. Kostní plazma – „depletovaná“ frakce (bez albuminu)	94
5.3.1.3. Kostní plazma – albuminová frakce (albumin)	100
5.3.2. „Pre-fractions“	102
6. DISKUZE	105
6.1. Studium bakteriální membrány <i>B. subtilis</i> vystaveného pH stresu	105
6.2. Proteomová analýza populace k antibiotiku rezistentních bakterií <i>E. coli</i> ...	109
6.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie	111
6.4. Proteomický přístup v jednotlivých projektech	114
7. ZÁVĚRY	116
7.1. Studium bakteriální membrány <i>B. subtilis</i> vystaveného pH stresu	116
7.2. Srovnávací proteomová studie adaptace populace <i>E. coli</i>	117
7.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie	118
8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	120

1. ÚVOD

Gelově-separační techniky se v proteomických laboratořích využívají při řešení nejrůznějších vědeckých projektů. Jejich výhodou je schopnost rozdělit stovky proteinů v jediném experimentu a získat tak celkový pohled na proteinovou situaci v daném biologickém systému. Nedílnou součástí takto získaných dat jsou i výsledky z následných experimentů, které získané bílkoviny určí, případně dojde k ověření výsledku nezávislou technikou. Výhody dvojrozměrné elektroforézy (**2-DE**) jsou vykoupeny i množstvím nevýhod zahrnující především zdlouhavost experimentu a také velkou náročnost na precizní provedení pokusu. Vzniklým chybám lze nicméně účinně čelit pomocí statistických metod a riziko nepřesností tím významně eliminovat.

Předkládaná práce se snaží ukázat, jak rozdílné projekty lze pomocí gelově-založených proteomových technologií řešit. Ve třech nezávislých vědeckých projektech, jejichž nedílnou součástí byla právě 2-D gelová elektroforéza, bylo nutno základní schéma metody upravit dle vstupního vzorku a zkombinovat s doplňujícími metodami, které by směřovaly k objasnění zadané hypotézy.

První projekt byl zaměřen na studium vlivu vnějšího prostředí (pH kultivačního media) na fyziologii půdní bakterie *Bacillus subtilis*, resp. její cytoplazmatickou membránu, tedy buněčnou strukturu, která je velmi důležitá jako detektor změn prostředí a plní bariérovou funkci. Z hlediska struktury se jedná o organizovaný a kompaktní celek a separace membránových a s membránou asociovaných bílkovin je komplikovaný proces. Je známo, že cytoplazmatická membrána je nejen u bakterií, ale i u rostlin a živočichů, schopna se svým složením přizpůsobit podmínkám okolního prostředí a tedy znalost bílkovinného složení je velmi žádoucí. Cílem tohoto projektu bylo sledovat tyto změny na membráně jako celku – její proteinové i fosfolipidové složce.

Druhý projekt byl zaměřen na sledování vývoje rezistence k antibiotiku u enterobakterie *Escherichia coli*. Studium celkového proteomu bakteriální populace v jednotlivých časových úsecích kontinuální kultivace přineslo původní výsledky o bílkovinných změnách v průběhu 120 generací. V tomto případě se jednalo o klasický elektroforetický experiment, kde nebyl problém s kvalitou či množstvím vzorku, ale vlastní interpretací obsáhlých proteomických dat.

Poslední projekt se zcela odchýlil od prokaryotního světa. Díky spolupráci s 2. LF UK byla možnost se podílet na projektu „Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie“. Zdrojovým materiálem byla kostní dřeň od dětských pacientů léčených na akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). U tohoto typu vzorku bylo velkou nevýhodou velké množství několika málo majoritních bílkovin, které následně bránily kompletní separaci proteinů v průběhu dělení pomocí 2-DE. Optimalizace protokolu si vyžádala zkoušení dalších technik pro jejich oddělení (imuno-afinitní kolony, „pre-frafrakcionace“ vzorku).

Řešení jednotlivých projektů ukázalo jak všestrannost metody, tak i její limity. Nicméně v kombinaci s dalšími nezávislými přístupy, lze získat hodnotná data a obdobné postupy pak využít v různých experimentech a v různých oborech.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Úvod do proteomiky

Termín „proteom” byl poprvé použit v roce 1994 Marcem R. Wilkinsem v Sydney pro označení celkového proteinového komplementu kódovaného genomem. Studium proteinů se začalo zabývat vědní odvětví na rozhraní chemických a biologických věd – **proteomika**, která se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem), rovněž však zkoumá strukturu a interakce proteinů.

Definice proteomu se objevovalo mnoho a až v roce 2001 organizace HUPO (Human Proteome Organization, www.hupo.org) formulovala cíle proteomiky poněkud přesněji jako identifikaci všech proteinů kódovaných lidským genomem (popřípadě genomy dalších, zejména tzv. modelových organismů) s následným stanovením

- a) jejich exprese v různých buňkách daného organismu - **expresní proteomika**,
- b) jejich subcelulární lokalizace v různých organelách, posttranslačních modifikacích, či vzájemných interakcí (**strukturní proteomika**),
- c) vztahu mezi strukturou a funkcí (**funkční proteomika**).

Jednotlivé podskupiny se překrývají a vždy je důležité si položit správnou otázku, na kterou nám má výsledná analýza odpovědět.

Jedním z hlavních cílů proteomického výzkumu je získání proteinové mapy – dvojrozměrného obrazu znázorňujícího (v metodicky ideálním případě všechny) buněčné proteiny jako skvrny (*spoty*), jejichž integrální absorbance je mírou jejich koncentrace za daných podmínek. Vytvoření proteinové mapy pomocí dvojrozměrné elektroforézy (2-DE), charakterizace jednotlivých proteinů, jejich identifikace v databázích a obrazová analýza 2-D gelů umožňují provádět experimenty, při nichž je srovnáváno komplexní proteinové složení vzorku za různých podmínek.

Naprosto zásadní roli ve všech oblastech proteomiky hraje bioinformatika, ať už ve formě digitalizace a obrazové analýzy 2-D gelů (viz výše), modelování trojrozměrných struktur proteinů a sítí interakcí proteinů, nebo ve formě tvorby, správy a vývoje veřejně přístupných databází. Jedním ze zajímavých projektů je např. švédský Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>), který shromažďuje informace o

expresi jednotlivých proteinů v různých tkáních (normálních i rakovinných) a v současné době má v souboru přes 9 milionů snímků.

I když by se mohlo zdát, že za pomoci dnes již poměrně dostupných RNA/cDNA "čipů" (*microarray*) hodnotících expresi na úrovni transkriptů získáváme dostatečně detailní informaci o aktuálně probíhajícím stavu realizace (exprese) genetické informace, je třeba si uvědomit, že:

ne všechny mRNA jsou určeny pro překlad do proteinu,

míra transkripce konkrétní, protein-kódující RNA, zdaleka ne vždy odpovídá míře exprese či dokonce aktivity kódovaného proteinu díky mnoha faktorům (mRNA, RNA sestřih, posttranslační modifikace proteinů atd.).

Stejně jako u ostatních "-omik", i rozvoj proteomiky byl zásadním způsobem ovlivněn vývojem na poli technologie. Reálný rozvoj oboru nastal *de facto* teprve po té, co k dnes již klasické metodě dvojrozměrné elektroforézy se přidal rozvoj "měkkých" ionizačních technik hmotnostní spektrometrie, kam se řadí desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI).

2.2. Metodické přístupy v proteomickému výzkumu

Existuje celá řada rozdílných postupů využívaných v proteomickém výzkumu jak z hlediska použité metodologie, tak účelu a cílů. V následující části budou zmíněny jenom vybrané a častěji používané přístupy:

- *Analytická proteomika* je založena na kombinaci separace bílkovin ze složitých biologických směsí, jejich identifikaci hmotnostní spektrometrií a na bioinformatickém zpracování získaných údajů. Hlavním cílem je identifikace bílkovin včetně stanovení molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin a určení posttranslačních modifikací. Dalšími cíli jsou např. charakterizace nekovalentních interakcí bílkovin s jinými látkami a kvantitativní stanovení heterogenity.
- *Strukturní proteomika* se zabývá studiem struktury bílkovin s použitím krystalografie, NMR (Nuclear Magnetic Resonance), MS (Mass Spectrometry) a řady dalších technik s cílem pochopit strukturní chování bílkovin (tvorbu a stabilitu nativní konformace) a využít tyto poznatky v proteinovém inženýrství při modifikacích bílkovin pro specifické účely (léčiva, průmyslové enzymy apod.).

- *Funkční proteomika* se zabývá nejen funkcí bílkovin, ale zejména studiem komplexních životních procesů, na nichž se podílejí a jejichž pochopení má zásadní význam pro studium vývoje organismu, či mechanismu a léčbu nemocí.
- *Diferenční (srovnávací) proteomika* je založena na analýze složitých směsí bílkovin, která sleduje změny kvalitativního a kvantitativního složení bílkovin při různých stavech organismu (např. normální vs. patologický stav / stres) s cílem nalézt a identifikovat rozdílně se vyskytující bílkoviny.
- „*High-throughput*“ *proteomika* je zaměřena na rychlé získávání velkého množství údajů o bílkovinách, což je důležité zejména pro vyhledávací („screeningové“) metody ve zdravotnictví, zemědělství, kontrole potravin atd.
- „*High-coverage*“ *proteomika* se zabývá získáváním údajů o sekvenci aminokyselin včetně posttranslačních modifikací bílkovin s cílem co nejvyššího pokrytí primární struktury (tj. stanovením pořadí co nejvyššího počtu aminokyselinových zbytků v bílkovině), což je důležité při studiu role bílkovin v životních procesech.
- „*Bottom-up*“ *proteomika* představuje „klasický“ postup identifikace bílkovin, kdy je daná bílkovina nejprve izolována ze směsi, potom enzymově rozštěpena na směs peptidů, které jsou charakterizovány hmotnostní spektrometrií (molekulová hmotnost, případně sekvence). K tomu jsou většinou využívány definované peptidy, tj. peptidy, které jsou určeny specifitou štěpení použitého enzymu (zpravidla trypsinu).
- „*Shotgun*“ *proteomika* je obecný postup pro identifikace bílkovin, kdy je neseparovaná směs bílkovin nejprve enzymově rozštěpena na směs peptidů, které jsou následně separovány vhodnou metodou (nejčastěji HPLC) a potom sekvenovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (často jsou využívány i nespecifické enzymy např. proteináza K). Jedna z metod se nazývá MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology, vícerozměrná technologie identifikace bílkovin).
- „*Top-down*“ *proteomika* je postup používaný pro identifikaci intaktních bílkovin bez použití enzymatického štěpení proteinu na peptidy. Daná bílkovina je nejprve izolována ze směsi a potom charakterizována (celá molekula je fragmentována v hmotnostním spektrometru).

2.3. Dvojrozměrná elektroforéza proteinů

Z historického pohledu je klíčovou technikou proteomiky vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza (**2-DE**), jedinečná metoda schopná účinně separovat komplexní směsi bílkovin. Ačkoliv byla poprvé popsána O'Farrellem a Klosem již v roce 1975, opravdu širokého rozšíření se jí dostalo až s rozvojem proteomiky na přelomu tisíciletí. Jde o instrumentálně náročnou techniku, která i při použití špičkových komerčních aparátů vyžaduje úzkostlivou laboratorní práci a zvláště čisté chemikálie. Celý proces sestává ze speciálního postupu přípravy vzorku, izoelektrické fokusace (IEF), elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl-sulfátu sodného (SDS-PAGE) a vizualizace obrazu separovaných bílkovin (proteinové mapy).

2.3.1. Příprava vzorku pro 2-DE

Tento krok je kvůli svému zásadnímu vlivu na výsledek dělení proteinů jednou z nejdůležitějších, ale i nejproblematictějších částí gelově-založené proteomiky a může se velmi lišit podle typu vzorku. Strategie je dána snahou o solubilizaci (převedení do rozpustného stavu) a desagregaci (omezení vzájemných interakcí) co největšího množství proteinů ve vzorku (Rabilloud 1996). Rovněž je nutné minimalizovat případné interference činidel, která zůstala ve vzorku z předchozích kroků (soli, SDS, inhibitory proteáz apod.).

Vzorek buněk či tkáně by měl být promyt v pufru s nepříliš velkou iontovou silou a poté fyzikálně nebo chemicky homogenizován. V závislosti na druhu vzorku lze zvolit „french press“, sonikaci, osmotickou či enzymatickou lýzi, mechanickou homogenizaci, případně další metody (Link 1999, Berkelman a Stenstedt 1998). Současně je nutné enzymově odstranit zbytky DNA a RNA. Při rozbíjení a v následných krocích je třeba eliminovat účinky proteolytických enzymů, jejichž působení může mít značný vliv na výsledný obraz proteinové mapy. Nabízí se aplikace inhibitorů proteáz (PMSF, AEBSF (Pefabloc[®]), EDTA), volba alkalického prostředí, krátkodobě také práce při zvýšené teplotě. V každém případě se doporučuje proces co možná nejvíce zkrátit. Pro studium pouze určité skupiny proteinů (membránové, ribozomální, cytosolární) se provádí „pre-fractionace“, obvykle za použití ultracentrifugace. Není-li vzorek dostatečně koncentrován, je možné zahustit jej

lyofilizací (Rabilloud 2000, Molloy *et al.* 1998), nebo precipitací acetonelem či trichloroctovou kyselinou (TCA).

Účinkem vzorkového pufru, s nímž je vzorek smíchán před nanesením na IEF gel, by měly být proteiny solubilizovány a desagregovány. Přítomnost vysoké koncentrace chaotropních činidel (močovina, thiomočovina (Rabilloud 1998)) brání asociaci proteinů vodíkovými můstky. Zwitteriontové či neiontové detergenty (CHAPS, NONIDET NP-40, TRITON X-100, Tween 20, oktylglukosid, SB 3-10, C8Ø, ASB 14) zajišťují rozpustnost hydrofobních částí bílkovin. Redukční činidla, dithiothreitol, dithioerythritol, tributylfosfin, či 2-merkaptóetanol, zamezují vzniku disulfidových můstků. Amfolyty či TRIS pufrují pH.

„Standardní“ solubilizační protokol pro 2-DE uvádí použití 5-8 M močoviny a 4% CHAPS (Berkelman a Stenstedt 1998, Rabilloud 2000, Weiss a Görg 2008). Pokud je jedná o solubilizaci membránových bílkovin je vhodné zvýšit podíl chaotropních činidel, např. 7 M močovina a 2 M thiomočovina a 4% CHAPS (Rabilloud *et al.* 1997). Použití thiomočoviny nelze uplatnit v případě použití trubičkových gelů s amfolyty (CA-IEF), kde thiomočovina inhibuje polymeraci akrylamidu (Rabilloud 1998). Navíc se osvědčil přídavek 1% ASB 14 (aminosulfobetain 14), (Chevallet *et al.* 1998).

V proteomice je stále velký problém s analýzou funkčně důležitých membránových proteinů a proteinů vyskytujících se v buňce v malém počtu kopií. Vzhledem ke své hydrofóbnosti se totiž membránové proteiny špatně rozpouštějí (solubilizují) a proto omezeně vstupují do IEF gelu. V důsledku toho jsou pak jejich skvrny na proteinové mapě pod limitem detekce 2-DE; často i v případě, že jejich množství v buňce je značné, a proto je třeba volit co nejúčinnější solubilizační postupy a detergenty. Dlouho užívaným postupem je vložení pre-solubilizačního kroku s použitím aniontového detergentu SDS. Tento detergent se vyznačuje značnou solubilizační silou, ale interferuje při IEF. Tento fakt lze ale obejít zředěním vzorku vzorkovým pufrém obsahujícím neiontový či zwitteriontový detergent (Harder *et al.* 1999). Rozpustnost proteinů v průběhu 2-DE analýzy zlepšují také dvoukrokové *ekvilibrace* IEF gelu s použitím jodacetamidu (Görg *et al.* 1987), uplatnění redukčního činidla tributylfosfinu (Herbert *et al.* 1998) a aplikace vzorku před rehydratací IPG proužku (Rabilloud *et al.* 1994).

Za zmínku stojí rovněž elegantní metoda diferenciální frakcionace (Molloy *et al.* 1998). Zde jsou proteiny postupně extrahovány ze vzorku několika činidly se vzrůstající solubilizační silou. Jednotlivé frakce jsou poté podrobeny 2-DE analýze.

Proteinová mapa se pak skládá z několika dílčích gelů, obsahujících proteiny s podobnou rozpustností.

Uvedené přístupy zlepšují solubilizaci již připraveného proteinového vzorku. Nicméně byly hledány i další postupy, které zahrnují cílenou izolaci membránových proteinů. Těmto technikám bude věnována samostatná kapitola (viz dále).

2.3.2. První rozměr: izoelektrická fokusace

Solubilizovaný vzorek, bílkoviny ve vzorkovém pufru, je separován izoelektrickou fokusací, během níž se bílkoviny rozdělí v elektrickém poli na základě svých izoelektrických bodů (pI). Jako prvních se pro tento účel začalo užívat trubičkových gelů o průměru 1-2 mm obsahujících amfolyty – látky vytvářející gradient pH (CA-IEF). Nosičové amfolyty byly původně složené ze směsi různě dlouhých řetězců oligoamino-oligokarboxylových kyselin. Jejich přednostmi byly vysoká pufrační kapacita a rozpustnost, dostatečná a stálá elektrická vodivost, absence biologických efektů, nízká molekulová hmotnost. Mezi jejich negativa patřila migrace a tedy nestabilita tvořeného pH gradientu.

Vzhledem k obtížné manipulaci s trubičkovými gely a často špatné reprodukovatelnosti se prosadily komerčně vyráběné proužky gelu s imobilizovanými pH gradienty (IPG-IEF) (Görg *et al.* 2000), jejichž nespornými výhodami je trvanlivost, reproducibilita, stabilita a také to, že neinterferují s redukčními činidly. Neopomenutelným kladem je také možnost aplikovat mnohonásobně větší objemy vzorků a větší množství proteinu (až 5 mg oproti 100 µg u CA-IEF), což pomáhá zachytit hydrofobní a slabě zastoupené proteiny a rozšiřuje možnosti následné identifikace. Byly však popsány i ztráty některých hydrofobních proteinů při použití metody IPG-IEF (Rabilloud *et al.* 1997, Rabilloud 1998). Na trh byly uvedeny také IPG proužky se sigmoidním pH gradientem (Bjellqvist *et al.* 1993), který na 2-D gelu rozšiřuje oblast působnosti pro hodnoty pI 5 - 7 příslušející největšímu množství proteinů ve vzorcích. Zvláštní přístup vyžaduje analýza bazických proteinů, které vlivem katodického driftu špatně vstupují do CA-IEF gelu. Navíc dochází v alkalickém pH k hydrolýze akrylamidu na kyselinu akrylovou a také k migraci redukujících činidel jako je např. DTT, které pak zanechává nevzhledné „šmouhy“ v proteinové mapě (Görg *et al.* 2000). Zpočátku se uplatňovala nerovnovážná izoelektrická fokusace (NEpHGE) (O'Farrell *et al.* 1977), nyní se část problematických případů daří vyřešit pomocí IPG-

IEF s úzkým rozsahem pH v alkalické oblasti (Görg *et al.* 1999, Cordwell *et al.* 2000, Guillonneau *et al.* 2001).

2.3.3. Druhý rozměr: elektroforéza v přítomnosti SDS

Trubičkový gel (CA-IEF, NEpHGE) nebo komerční proužek (IPG-IEF), obsahující proteiny rozdělené podle izoelektrických bodů (pI), je po *ekvilibraci* v ekvilibračním pufru umístěn na vrchní hranu deskového gelu, případně zalit agarózou s nízkým bodem tuhnutí. Deskový gel obsahuje dodecyl-sulfát sodný, dávající proteinům uniformní specifický náboj (tj. náboj vztažený na jednotku relativní molekulové hmotnosti), takže ty jsou separovány pouze na základě svých velikostí (relativních molekulových hmotností). Pro dobrou separaci je opět nutný přídavek redukčního činidla (DTT, mercaptoetanol).

Používá se obvykle gelů o koncentraci cca 10-13 % (*m/V*) akrylamidu. Ve snaze o lepší rozlišení je někdy užíváno gelů s hustotním (porozitním) gradientem (v rozmezí 7-20 % (*m/V*) akrylamidu) anebo diskontinuálních gelů, složených z koncentrační a separační části. Tyto postupy ale znamenají vnesení dalšího kroku, který může být příčinou zhoršení reprodukovatelnosti celé metody. Doporučuje se proto používat buď gelů bez gradientu, nebo počítačově řízeného nalévání gradientových gelů (Humphery-Smith *et al.* 1997), popřípadě komerčních hotových gelů.

2.3.4. Vizualizace: barvení 2-D gelů

Po proběhnutí SDS-PAGE je třeba proteiny v gelu zafixovat proti difuzi a vizualizovat (obarvit), přičemž fixační krok již bývá zařazen do barvicího postupu. V dnešní době existuje velká škála barvicích technik, nicméně vždy musíme přihlížet k několika parametrům a to k citlivosti metody, možnostem kvantifikace, linearitě signálu, dynamickému rozsahu, kompatibilitě s hmotovou spektrometrií (MS), toxicitě barvicí látky a v neposlední řadě k ceně.

Nejjednodušší možností vizualizace proteinů na dvourozměrném gelu je použití **barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB)**. Klasická CBB je vyznačuje citlivostí 50-100 ng, horší kvantifikací a nízkou cenou (Neuhoff *et al.* 1988). Koloidní CBB je cenově náročnější, ale citlivost je vyšší (10-30 ng), a je dobře kvantifikovatelná narozdíl od barvení stříbrem. (Candiano *et al.* 2004, Westermeier 2006). Obarvený gel je poté možné použít pro analýzu hmotnostní spektrometrií (MS) (Matsui *et al.* 1999).

10–100x citlivější je **barvení stříbrem**. Stříbrné ionty se však váží jen na některé aminokyselinové zbytky (Asp, Glu, His, Cys, Met, Lys), metodu proto nelze považovat za plně kvantitativní (Rabilloud *et al.* 1994). Tohoto barvení bylo publikováno mnoho variant s různým složením činidel a s různou délkou jednotlivých kroků; v zásadě je lze rozdělit na tzv. kyselé metody na bázi vodného roztoku AgNO_3 a tzv. alkalické metody na bázi diamin-komplexů Ag^+ v alkalickém prostředí. Při barvení stříbrem je vhodné uplatnit některý z možných zcitlivujících (*senzitizačních*) kroků s cílem zlepšit tvorbu tzv. latentního obrazu (Rabilloud 1990). Byly vyvinuty rovněž modifikace kompatibilní s následnou MS charakterizací (Shevchenko *et al.* 1996, Gharahdaghi *et al.* 1999, Yan *et al.* 2000).

Při funkčních studiích, kdy má být zjištěna indukce proteinů v určitém definovaném časovém okamžiku (např. po přidavku určitého faktoru či při změně podmínek), se někdy používá inkorporace **radioaktivně značeného metioninu** (^{35}S Met) do polypeptidového řetězce syntetizovaného za sledovaných podmínek. Buňky jsou poté podrobeny 2-DE analýze, přičemž výhradně indukované proteiny jsou detegovány na rentgenovém filmu autoradiografií či v současnosti již výhradně s použitím tzv. „fosfoimageru“, zařízení využívajícího laserové technologie pro „přečtení“ odrazu vyzařujících skvrn do citlivé vrstvy vytvořené na bázi sloučenin Europa .

Velký rozmach nyní zažívají **fluorescenční metody** barvení typu SYPRO (Patron 2000, Berggren *et al.* 2000, Smejkal *et al.* 2004), (SYPRO Ruby, Orange). Tyto metody jsou podobně jednoduché a kvantitativní jako barvení Coomassie, avšak citlivostí srovnatelné s barvením stříbrem a navíc kompatibilní s MS charakterizací. Mezi nevýhody patří vysoká cena, komplikovaný sběr spotu, protože k vizualizaci proteinových skvrn dochází pouze ve *fosfoimageru*, a případně i toxicita. Citlivost metody je kolem 4-8 ng (Deep Purple, GE Healthcare), nebo 1-2 ng (SYPRO Ruby, Molecular Probes).

Velmi sofistikovanou možností je tzv. „2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis“ (**2-D DIGE**), (Ünlü *et al.* 1997). Zde probíhá celá 2-DE analýza se směsí fluorescenčně již předznačených vzorků, jejichž proteinové složení se srovnává. V analýze za použití 2-D DIGE jsou nejdříve dva rozdílné vzorky kovalentně označeny rozdílnými cyaninovými barvami (Cy3 a Cy5). Dostupná je ještě barva Cy2, která se používá ke značení tzv. interního standardu, který vzniká smícháním ekvimolárních

množství dvou analyzovaných vzorků a který se využívá k normalizaci dat mezi gely. To minimalizuje experimentální rozdíly, zvyšuje spolehlivost *matchingu* (ztotožnění) a umožňuje kvantifikaci rozdílných gelů v experimentu. Skenování gelu probíhá při třech různých vlnových délkách, odpovídajícím vlnovým délkám excitace barev Cy2, Cy3, Cy5. Po skončení celého procesu jsou srovnány fluorescenční obrazce 2-D gelů při různých vlnových délkách. Díky tomuto postupu je omezen vliv odchylek 2-DE analýzy, protože separace obou vzorků probíhá za identických podmínek (Görg *et al.* 2004, Issaq a Veenstra 2007).

2.3.5. Metody analýzy obrazu a obrazové databáze 2-D gelů

Jak už vyplývá z výše uvedeného, jednou z hlavních náplní gelově-založené proteomiky je, po metodické stránce, **tvorba proteinových map** vycházející ze srovnávání obrazů 2-D gelů. V první fázi je obraz sejmout v digitální podobě, přičemž se využívá

- CCD („charge coupled device“) kamer,
- densitometrů a skenerů pro snímání obrazu ve viditelném světle,
- „fluoroimagerů“ pro detekci fluorescence a
- „fosfoimagerů“ citlivých na radioaktivní značení (Miura 2001).

V současnosti používané skenery v sobě sdružují funkce výše uvedených individuálních zařízení.

Důležitými parametry pro následující analýzu obrazu je rozlišení daného přístroje (počet pixelů na jednotku délky – dpi, μm), bitová hloubka (8 bitů – 256 stupňů šedi vs. 16 bit - 65536) a dynamický rozsah (je nutné sledovat saturaci spotu). Následuje obrazová analýza, kterou provádíme pomocí některého z dostupných počítačových programů.

Speciální *software* pak umožňuje detegovat skvrny na 2-D gelu, odečítat pozadí, navzájem přiřazovat skvrny na různých 2-D gelech (ztotožnění, „matching“), vzájemně standardizovat a kvantitativně vyhodnocovat gely, čímž jsou částečně eliminovány nepřesnosti vzniklé během komplikované 2-D analýzy a při barvení gelů. Dále lze konstruovat proteinové mapy a obrazové databáze.

Počítačových programů bylo během let vyvinuto více typů. K nejpoužívanějším dnes patří PC programy s unixovým jádrem **PDQUEST** a **MELANIE** II, III a vzájemně

blízké produkty založené na PC platformě AIDA, Phoretix 2-D a ImageMaster. Existují i volně dostupné programy jako GelScape, nebo Open2Dprot. Praktické rozdíly mezi jednotlivými druhy komerčního *software* lze najít zejména v počtu současně srovnávaných gelů a ve způsobu přiřazování skvrn („matching“).

Jelikož integrální absorpenci každé skvrny lze považovat za kvantitativní ukazatel exprese proteinu, je možné pomocí 2-D *software* srovnávat parametry skvrn na různých 2-D gelech a vyvozovat závěry o expresi proteinů za různých podmínek.

Získané gely mohou být ukládány do obrazových databází podle typu vzorku, přičemž mnoho databází je dostupných na internetu (pro přehled viz Langen a Berndt 2001). Některé typy komerčních programů pro analýzu 2-DE gelů umějí s těmito databázemi komunikovat a vytvářet vlastní internetové stránky.

2.3.6. Limity 2-D elektroforézy

Jako každá metoda má i 2-DE svá omezení. Lze si představit, že v buňce jsou tisíce aktivních genů, které se přepisují na několika-násobek individuálních proteinů. I na velkém gelu je možno zachytit maximálně 5 000–8 000 spotů tedy jen část přítomných proteinů. Přibližně 60–90% z nich je mimo možnosti detekce. Toto číslo je samotné dosti vysoké a ještě je nutné připočítat ztráty během separace, při rehydrataci (20–55%), IEF (7–14%), ekvilibraci (17–24%), SDS-PAGE, fixaci a barvení; celkově až 80% proteinů může být ztraceno v průběhu konvenčního 2-DE experimentu (Zhou *et al.* 2005). Proto se objevují postupy, jak tuto techniku nahradit. Jedním z přístupů je i možnost analýzy bílkovinné směsi přímo, bez předchozí gelové separace. Bohužel přímá detekce a identifikace proteinů pomocí tandemové hmotové spektrometrie má také své problémy v podobě velkého množství výstupních dat spolu s vysokým procentem chyb. Proto má dělení bílkovin pomocí 2-DE stále svůj smysl a je snahou i nadále zlepšovat dílčí kroky separace a zvyšovat citlivost značení.

Nedostatky 2-DE, mezi než patří vedle problémů s analýzou hydrofobních proteinů, také časová a manuální náročnost, vedou k hledání dalších alternativních metod. Přesto však 2-DE zůstává velmi rozšířenou a někdy i nejvhodnější metodou ke svému účelu (Rabilloud 2002).

2.3.7. Další metody používané v proteomice

Zkrácení klasického gelového proteomického postupu bylo např. dosaženo analýzou proteinů přímo na IPG prouzcích pomocí **MALDI-TOF MS** a tvorbou „virtuálních“ 2-D gelů (Walker *et al.* 2001).

Mezi další přístupy nahrazující gelové technologie patří **SELDI-TOF MS** (Reddy a Dalmasso 2003). Ta díky své rychlosti a možnosti srovnávat v jednom běhu více vzorků se jeví jako velmi vhodnou pro experimentální „screening“ vzorků pacientů. Pro použití této metody v klinické proteomice a diagnostice je potřeba zvýšit její rozlišení, citlivost a reprodukovatelnost.

Dalším, recentním přístupem, je systém „**The ProteomeLab™ PF 2D system**“ (Sheng *et al.* 2006, Levreri *et al.* 2005, Barre a Solioz 2006), který umožňuje analýzu komplexních proteinových směsí bez použití gelového nosiče. Separace probíhá na principu kapalinové chromatografie, kde jsou proteiny nejdříve děleny podle jejich izoelektrického bodu a následně jímáné frakce mohou být dále děleny podle molekulové hmotnosti. Získané vzorky lze ihned analyzovat hmotovým spektrometrem. Počítačově lze pak vytvořit obdobu gelové proteinové mapy.

Zcela odlišný alternativní přístup představuje komplexní analýza proteinů založená na skupině nových chemických *reagentů* **ICAT** („isotope-coded affinity tags“), afinitní chromatografii a tandemové hmotnostní spektrometrii (Gygi *et al.* 1999). Tato metoda umožňuje paralelní analýzu až osmi vzorků v jednom běhu a poskytuje jak informaci kvalitativní tak i kvantitativní. Podstatné je, že izobarický charakter **iTRAQ reagentů** nevede při použití dvou a více vzorků ke zvýšení komplexity MS ani MS/MS spektra. Její výhoda před ostatními metodami tkví ve zvýšené spolehlivosti získaných dat a ve schopnosti označit všechny peptidy ve směsi. Hlavní limitace této metody spočívá v malém počtu vzorků, které mohou být kvantitativně srovnávány a tedy v nemožnosti získat statisticky relevantní data.

Další alternativní metoda je založena na **proteinových čípech**. Jedná se o vysokovýkonný nástroj k monitorování a určování stupně proteinové exprese a k výzkumu interakcí proteinů s biologicky významnými molekulami. Umožňuje velmi specifický pohled na genovou expresi na proteinové úrovni, lepší pochopení takových pochodů jako jsou signální cesty, apoptóza a studium a pochopení funkce efektorových a pleiotropních proteinů. Velmi významná je aplikace proteinových čipů v sérovém profilování nádorových *markerů* či v různých buněčných fyziologických studiích

(Spisak *et al.* 2007). Princip proteinových mikročipů je takový, že kombinují výhody „Western blottingu“ a „cDNA microarray“ technologie. Můžeme je považovat za modifikovanou Western hybridizaci, kde jsou protilátky nebo antigeny (v případě reverzně fázových proteinových čipů) navázány ve fixní pozici na povrch mikročipu. Po nanesení vzorku dochází ke specifické interakci mezi navázanými proteiny a proteiny nanášeného vzorku. Následuje detekce různými detekčními metodami (Spisak *et al.* 2007). Velkou výhodou čipů je možnost paralelního vyšetřování několika stovek až tisíců složek vzorku. Následná snadná automatizace činí tak tuto metodu velmi vhodnou pro klinický výzkum. Mezi nevýhody patří potřeba poměrně velkého množství nanášeného vzorku (50-200mg), nutnost zajistit konformační stabilitu proteinů, či možnost výskytu nespecifických interakcí a to zejména v důsledku *cross-reaktivity* a *multispecifity* proteinů, nebo špatná detekce málo se vyskytujících proteinů a v neposlední řadě i vysoká cena.

2.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda, která umožňuje přesné měření molekulární hmotnosti široké škály látek. Jelikož zkoumaná látka musí být převedena jako intaktní do plynné fáze, využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu proteinů (ale i polysacharidů či oligonukleotidů) bylo umožněno až vývojem "měkkých" ionizačních technik hmotnostní spektrometrie, kam se řadí desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI).

Ionizační techniky:

- **MALDI:** „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization“ - ionizační technika používaná v hmotnostní spektrometrii, která umožňuje ionizovat biomolekuly, jež mají sklon se rozpadat při použití ostatních ionizačních metod. Hlavním rozdílem, jímž se liší MALDI od ostatních technik, je použití matrice, která chrání biomolekuly před destrukcí přímého laserového paprsku. Analyzované proteiny jsou krystalizovány spolu se sloučeninou tvořící matici a poté jsou převedeny do plynné fáze laserovým paprskem.
- **Ionizace elektrosprejem (ESI)** - při ionizaci elektrosprejem prochází vzorek (v roztoku) kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Vzorek se na výstupu z kapiláry rozprašuje do vakuové trubice, vznikají malé kapičky, které

nesou vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polarity vloženého napětí na kapiláru. Někdy se používá neutrální plyn (N₂) který napomáhá lepšímu rozprašování roztoku a vypařování rozpouštědla. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšení velikosti kapiček a tím i ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Ionty pokračují do analyzátoru.

Používají se i různé **způsoby analýzy**, mezi často používané patří:

- **TOF** - ionizované proteiny jsou urychleny elektrickým polem do hmotnostního analyzátoru, kde jsou ionty rozděleny na základě jejich hmotnosti a náboje. Molekulové hmotnosti iontů jsou zjištěny měřením doby jejich letu k danému detektoru a vztaženy k poměru hmotnosti analytu a jeho náboje (m/z).
- **Kvadrupól** - se skládá ze 4 paralelních kovových tyčí. Vždy protilehlé tyče mají buď kladný, nebo záporný náboj. Mezi tyčemi s opačným el. nábojem vzniká elektrostatické pole (elektrické napětí). Ionty vstupují do kvadrupólu (mezi tyče) podélně. Pouze ionty s určitým poměrem m/z mohou dosáhnout detektoru kvůli danému elektrickému napětí. Ostatní ionty nestabilně oscilují a jsou nakonec přitaženy el. polem některé z tyčí. Při změně el. napětí se změní taky poměr m/z iontů, které dosáhnou detektoru. Získaná data lze zobrazit jako hmotnostní spektrum v podobě četnosti výskytu iontu (intenzita) s daným poměrem m/z v závislosti na m/z .

Identifikace proteinu se provádí v zásadě dvěma základními způsoby:

- **„Peptide mass fingerprinting“** - protein je naštěpen trypsinem nebo jiným proteolytickým enzymem na menší peptidy, jejichž přesné hmotnosti jsou pomocí MS změřeny. Spektrum těchto hmotností je pak porovnáno s teoretickými spektry, která jsou vypočítána ze sekvencí proteinů v dostupných databázích (pomocí bioinformatických metod). Výhody tohoto přístupu spočívají ve vysoké citlivosti hmotnostní spektroskopie pro malé molekuly, ve snadnosti, se kterou jsou peptidy získány štěpením, a elucí z gelu. Nevýhodou je, že se stanoví pouze relativní molekulová hmotnost proteinu a jednotlivých peptidů a také použití je možné pouze u známých, již sekvenovaných proteinů.
- **„Peptide fragment sequencing“** - tandemová MS umožňuje zvolit peptid, který je následně fragmentován kolizí s inertním plynem. Profil výsledků fragmentace

(„fragmentation pattern“) poskytuje částečnou či úplnou informaci o sekvenci proteinu, která je vodítkem pro hledání shody s daty uloženými v databázích.

Kromě samotné identifikace proteinů je MS neocenitelným nástrojem pro analýzu posttranslačních modifikací proteinů, protože umožňuje lokalizaci dané modifikace uvnitř proteinu a napomáhá rovněž zjištění charakteru takové modifikace.

2.5. Dělení komplexních vzorků

2.5.1. Frakcionace krevní plazmy

Tělní tekutiny (krev, moč a další) představují komplexní směsi látek, jejichž podstatnou část tvoří peptidy a proteiny. Analýza peptidů a proteinů je schopna poskytnout množství informací o lidském zdravotním stavu. Zvláště od proteomické analýzy krevní plazmy se dá očekávat velký přínos při diagnostice nemocí a terapeutickém monitorování. Plazma není jen významným klinicky testovaným vzorkem, je také nejkomplexnější verzí lidského proteomu. Kromě „klasických“ plazmatických proteinů, které zprostředkovávají její funkce, obsahuje také všechny proteiny uvolňující se z tkání, množství různých protilátek a látek hormonální povahy. Vedle bohatého spektra proteinů, jsou tyto proteiny v plazmě zastoupeny v širokém rozsahu koncentrací. Koncentrace některých těchto proteinů je ve srovnání s albuminem až o deset řádů nižší (Quian *et al.* 2006), což výrazně znesnadňuje jejich analýzu.

V současné době je zaměřena velká pozornost na charakterizaci jednotlivých složek tělních tekutin a odhalení souvislosti mezi výskytem, případně množstvím určitých peptidů/proteinů a jednotlivých nemocí. Z publikovaných proteomických i jiných prací vyplývá, že změny v zastoupení a koncentraci proteinů nastávají při mnoha, ne-li ve všech patologických stavech. Takto nalezené potencionální *markery* chorob lze využít pro jejich včasnou diagnostiku, protože změny hladiny jednotlivých *markerů* odpovídají projevu choroby na molekulární úrovni a často se dají detegovat dříve, než se projeví klinické příznaky (Rifai *et al.* 2006). Pokud bychom pomocí metod molekulární biologie dokonale prozkoumali a pochopili funkci geonomu a proteomu, tak by bylo možné plně pochopit mechanismy vzniku a vývoje nemocí.

V plazmě se vyskytují řádově tisíce proteinů (Anderson a Anderson 2002), mnohdy s různými posttranslačními modifikacemi, a to v rozmezích koncentrací již

zmíněných deseti řádů. Přímou analýzou takto složité směsi nelze získat informaci o málo zastoupených složkách a proto podmínkou podrobného studia plazmy je rozdělení proteinů do jednodušších frakcí vhodnou kombinací separačních technik (LC, GE, IEF, aj.) a tyto jednotlivé frakce následně analyzovat.

2.5.1.1. Krevní plazma a plazmatické proteiny

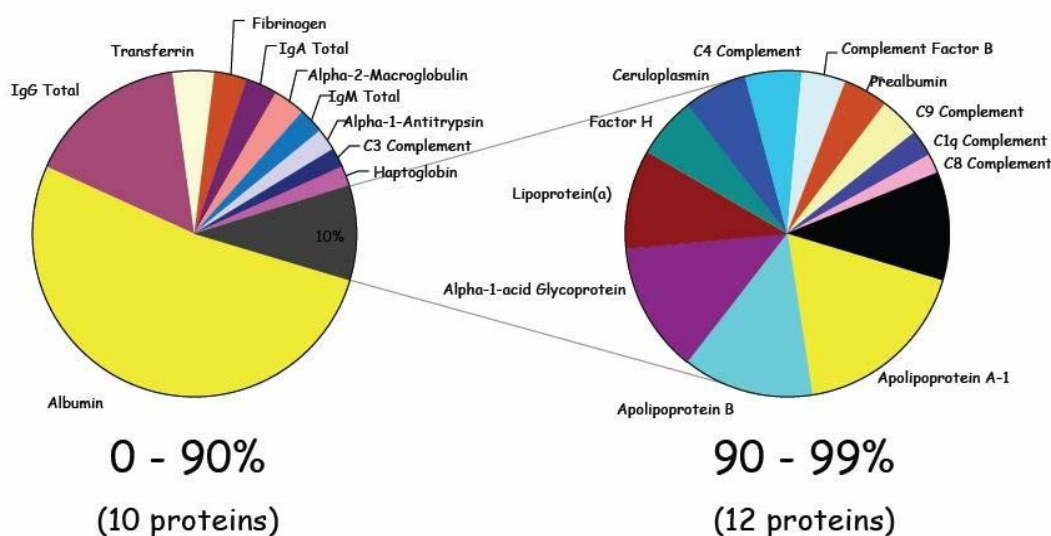
Mimobuněčné tekutiny (tkáňový mok 70%, krevní plazma 25% a další 5%) zabírají 20% hmotnosti lidského těla. Tkáňový mok obklopuje téměř všechny buňky lidského těla a s krevní plazmou za normálních podmínek komunikuje přes epitelální stěny kapilár. Krevní plazma je tvořena 91-92 % z vody, 7 % zaujímají proteiny, zbytek připadá na glukózu, lipidy, kyselinu mléčnou, cholesterol a další organické i anorganické látky. *Abundantní* plazmatické proteiny (albuminy 60%, globuliny 35%, fibrinogen 5%), které jsou syntetizovány hepatocyty a lymfocyty, zajišťují funkce jako je srážení krve, udržování stálého vnitřního prostředí (osmotický tlak a pH), transport metabolitů, hormonů, iontů a dalších látek, imunitní reakce apod.

Krevní plazma se obvykle připravuje tak, že krev je odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem (např. heparin, EDTA) a následně se centrifugací odstraní krevní buňky. Krevní sérum vzniká tím, že se krev (nebo jen plazma) naopak nechá srazit a posléze se odstraní sraženina.

Plazma tedy na rozdíl od séra obsahuje srážecí faktory (trombin, fibrinogen a další) a neproběhlo v ní srážení, které může působit změny (nejčastěji proteolytická štěpení) nejenom srážecích faktorů ale i dalších proteinů. Na druhou stranu sérum neobsahuje srážecí faktory a je proto jednodušším vzorkem.

Plazma není významná jen z hlediska diagnostického, je důležité také zmínit, že je ve velkém rozsahu sbírána, frakcionována a purifikované proteiny jsou pak použity pro terapeutické účely.

Zastoupení nejvíce *abundantních* plazmatických proteinů ilustruje **Obr.1**.

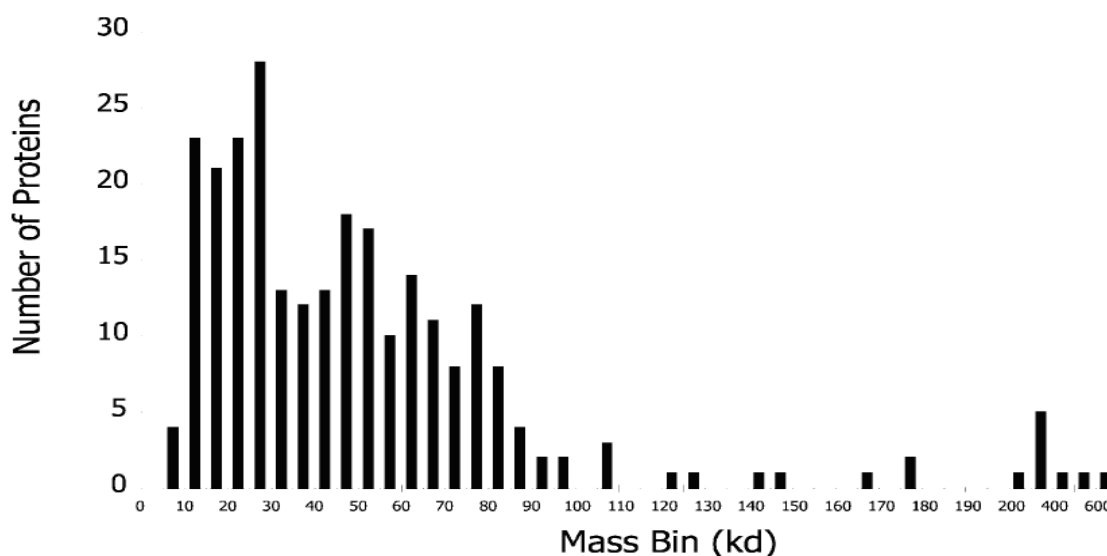


The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. Anderson, N.L. and Anderson, N.G., Molecular and Cellular Proteomics, 1.11, 845-867 (2002)

PPI

OBR.1.: Zastoupení nejvíc abundantních proteinů v plazmě: Levá část zobrazuje 10 nejvíce abundantních proteinů, pravá část dalších 12. Na ostatní proteiny tedy připadá 1% z celkového množství plazmatických proteinů. (Anderson a Anderson 2002).

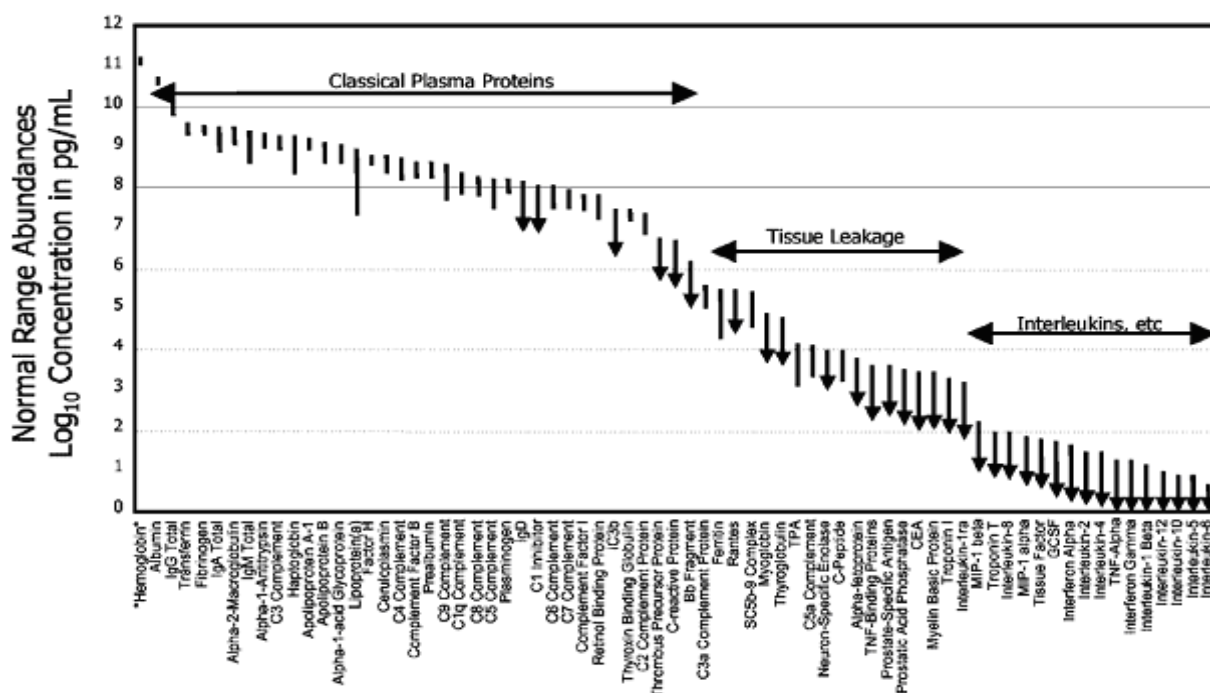
V dnešní době lze v plazmě detegovat 1175 *neredundantních* genových produktů (Anderson *et al.* 2004). Ve studii v roce 2002 (Anderson a Anderson 2002) je tabelováno 289 proteinů nalezených v literatuře, jejich histogram je na **Obr.2**. Z histogramu vyplývá, že velká část proteinů má velikost menší než 45 kDa, což je filtrační limit ledvin. Proteiny menší, než je tato hranice by měli být z plazmy rychle odstraňovány. To, že se v plazmě vyskytují může být vysvětleno jejich agregací do větších komplexů, nebo musí mít nějaký specifický retenční mechanismus.



OBR.2.: Histogram velikostí 289 plazmatických proteinů (Anderson a Anderson 2002)

Interakcí mezi proteiny se dá předpokládat velké množství a ani zdaleka nejsou všechny prozkoumány. Při analýze či frakcionaci je potřeba s těmito interakcemi buď počítat, nebo se je snažit eliminovat (například denaturací).

Rozmezí *abundancí* plazmatických proteinů demonstruje **Obr.3**. Jsou na něm zobrazeny referenční intervaly 70 proteinů, které byly validovány a používány komerčními klinickými laboratořemi v roce 2002. V dnešní době je takových proteinů kolem dvou set.



OBR.3.: Referenční intervaly koncentrací 70 plazmatických proteinů (Anderson a Anderson 2002).

Obr.3 dokazuje, že klinicky významné jsou vysoce i méně *abundantní* proteiny. Měřené plazmatické proteiny lze rozdělit do třech skupin podle klesající *abundance* a to na klasické plazmatické proteiny, proteiny uvolňující se z tkání a nakonec cytokiny. *Abundantní* proteiny jsou již poměrně extenzivně prozkoumávány, a proto se do centra zájmu dostávají proteiny méně *abundantní*. Proteiny uvolňující se z tkání se dají použít k měření stupně jejich poškození, záleží ale na tom do jaké míry jsou cytozolické a jak jsou rozpustné. S postupným vylepšováním měřících technik by mělo být možné podle uvolněných proteinů určit druh poškozené tkáně a míru poškození. Cytokiny účinkující lokálně (v místě infekce, či zánětu) se také uvolňují z tkání, ale ne v důsledku destrukce

buněk. Jejich koncentrace v plazmě už není efektivní, ale zjištěná změna jejich hladiny může být klinicky významná.

2.5.1.2. Technika pro analýzu plazmy - dvojrozměrná elektroforéza

Postupné vylepšování a kombinování 2-DE s chromatografií a hmotnostní spektrometrií vede k vypracování technik mnohorozměrné separace. Tento vývoj v technikách vedl k exponenciálnímu růstu počtu objevených plazmatických proteinů v posledních 70 letech. Zejména v posledních 20 letech tvořily 2-D gely jádro proteomických technologií a byly použity u většiny prací zabývajících se krevní plazmou. Nevýhodami této techniky jsou nedostatečná schopnost separovat kyselé a bazické proteiny a proteiny s malou (<15 kDa) nebo naopak velkou (>200 kDa) molekulovou hmotností, reprodukovatelnost, pracnost a časová náročnost.

Už v 70. letech bylo možno rozeznat na gelu plazmy kolem 300 spotů (Anderson a Anderson 1977). Identifikace proteinů byla následně prováděna podle specifických *paternů*, reprezentovaných „řetízky“ *spotů* (376 *spotů* identifikovaných jako 49 proteinů) (Anderson a Anderson 1991), později mikrosekvenováním (Hughes *et al.* 1992), imunologicky, a v poslední době především pomocí MS. Maximální dosažitelný počet rozeznatelných *spotů* při provedení 2-DE bez frakcionace či „deplece“ je kolem 600. To je způsobeno tím, že několik málo *abundantních* proteinů, jako jsou glykoproteiny a imunoglobuliny, které jsou velmi variabilní v lokalizaci i délce glykozylace, zabírají velký podíl z celkového množství, které lze separovat v prvním rozměru, navíc v druhém rozměru vytvářejí mnoho velkých *spotů*, které překryjí ostatní proteiny.

Je více cest jak tento problém překonat. Jednou z nich je „**deplece**“, resp. „imunodeplece“, kdy jsou ze vzorku pomocí afinitní chromatografie vychytány definované *abundantní* proteiny. Komerčně jsou dostupné různé velké kolonky s definovanými navázanými protilátkami (Beckman Coulter, nebo BioRad).

Další možností je **frakcionace** (vzorek je rozdělen do frakcí pomocí chromatografie) a pro každou frakci je pak provedena 2-DE. Tímto způsobem lze v 1 vzorku identifikovat až 250 proteinů, které odpovídají 1000-1500 *spotům*. To přitom není horní limit, který lze dosáhnout pomocí systému LC-2DE-MS, limitem je spíše pak cena a množství práce. Více o tomto typu separace viz **Kap. 2.5.2.**

Velký význam měly 2-DE studie *abundantních* proteinů. Právě díky velké senzitivitě k molekulárnímu náboji a délce polypeptidů je 2-DE velmi efektivním nástrojem pro zkoumání genetických variant proteinů, proteolytických štěpení a glykozylace (Harrison *et al.* 1991). Poprvé byly 2-D gely v klinické praxi použity pro diagnostiku geneticky podmíněné nemoci metabolismu sacharidů („carbohydrate-deficient glycoprotein syndrom“), (Henry 1997), kdy dochází k systematické ztrátě mnoha různých vysoce glykozylovaných proteinů. Pomocí 2-DE bylo, od doby jejího zavedení, objeveno mnoho korelací mezi množstvím a výskytem specifických proteinů, dnes se však stále více začínají uplatňovat i jiné techniky.

2.5.2. Izoelektrická frakcionace v proteomice

Vysoce komplexní vzorky, mezi než patří lidské tekutiny (plazma), buněčné lyzáty či tkáňové extrakty, určené pro proteinovou analýzu, si přímo vynucují před vlastní proteinovou identifikací či kvantitativní analýzou (LC-MS či MALDI-MS) určitou formu frakcionace („pre-frakcionace“). Tedy možnost, jak snížit složitost vzorku, aby jej bylo možné lépe analyzovat bez artefaktů.

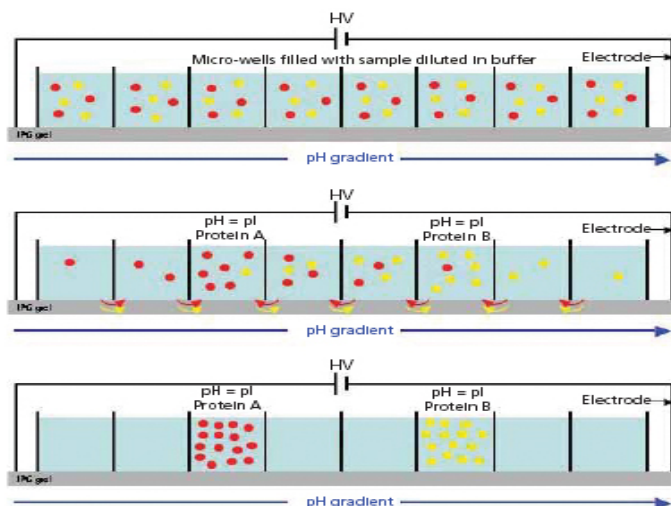
Frakcionační techniky mohou zahrnovat 1-D či 2-D gelovou elektroforézu, iontovou či gelovou chromatografii a afinitní techniky. Z izoelektrické fokusace (IEF) se vyvinul účinný nástroj pro proteinovou „pre-frakcionaci“, protože disponuje vysokým rozlišením bílkovin v relativně krátkém separačním čase a navíc není tak finančně nákladná (White a Cordwell 2005). Izoelektrické frakcionační systémy jsou schopny fokusovat v roztocích, případně ve fázích gelových či ne-gelových. Následující řádky souhrnně přibližují 4 komerční systémy pro izoelektrickou fokusaci proteinů či peptidů.

2.5.2.1. OFFGEL frakcionátor

OFFGEL frakcionátor od firmy Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornie) využívá neotřelý přístup pro IEF frakcionaci. Pro fokusaci využívá imobilizovaných pH gradientových (IPG) *stripů*. *Strip* je utěsněn několika komůrkovým rámečkem obsahujícím vzorek a fokusační roztok (**Obr.4**). Během separace části vzorku migrují přes IPG gel a tak dochází k fokusaci bílkovin dle jejich izoelektrického bodu. Fokusace je dokončena, když proteiny doputují do odpovídající komůrky přes IPG *strip*. Pre-fokusovaný vzorek lze tak získat v roztoku z požadované části fokusačního zařízení.

Tento typ IEF frakcionace redukuje riziko vysrážení proteinů během fokusace. Při frakcionaci lze využívat *stripy* s širokým i úzkým rozmezím pH (tj. pH 3-10 nebo pH 4-7). Nanáška proteinů by se měla pohybovat v rozmezí 50 ug až 5 mg. Fokusační doba se pohybuje kolem 12-24 hod a problém může nastat při vysoké koncentraci solí ve vzorku.

OBR.4.:



2.5.2.2. BioRad Rotofor systém

První izoelektrický fokusační systém založený na kapalně bázi byl zaveden před 20 lety v laboratořích firmy BioRad (Herkules, Kalifornie) a to na základě technologie vyvinuté v laboratoři Milana Biera (Egen *et al.* 1984). Postupně byly uvedeny do oběhu 3 systémy, které pojmu různé množství vzorku (ve formátu „standard“, „mini“ a „micro“). Vzorek je separován do několika frakcí ve válcovité fokusační komoře rozdělené do oddílů pomocí polyesterových přepážek. Fokusační komora je ukončena „anolytovou“ a „katolytovou“ komůrkou, resp. membránou, která jej tak odděluje od vzorku.

„Standard“ a „mini“ systém obsahuje 20 oddílů a „micro“ verze pouze polovinu. Srovnání jednotlivých verzí ukazuje **Tab.1**. Všechny uvedené systémy lze během fokusace chladit. Navíc je umožněna rotace či oscilace zařízení z důvodů omezení konvekce a gravitace v roztoku. Sběr fokusovaných vzorků lze provést i pomocí externího sběrného zařízení napojeného na vakuovou pumpu. Čas pro frakcionaci u všech systémů se pohybuje kolem 3 hodin.

TAB.1: Typy Rotofor IEF frakcionátoru

Table 1: Rotofor IEF Fractionator Specifications			
Specification	MicroRotofor	Mini Rotofor	Standard Rotofor
Number of fractions	10	20	20
Sample volume	2.3–2.5 mL	18 mL	35–60 mL
Sample load	Microgram to milligram	Microgram to milligram	Milligram to gram
Fraction volume	100–250 μ L	700 μ L	1.75–3 mL
Fractionation power setting	1 W	13 W	15 W

2.5.2.3. ZOOM IEF frakcionátor

Tento frakcionátor od společnosti Invitrogen (Carlsbad, Kalifornie) byl vyvinut na základě metody popsané autory Zuo a Speicherem (2000) k frakcionaci komplexních proteomů za denaturačních podmínek s využitím IEF (kapalná báze) v malém množství vzorku. Zařízení se skládá ze vzorkových komůrek propojených za sebou a zároveň oddělených membránou („ZOOM disky“) obsahujícími kovalentně navázané pufrů o definovaném pH. Tyto jednorázové disky jsou polyakrylamidové gely osazené na polyethylenové fritě. Jednotlivé disky jsou vkládány mezi sousedící komůrky a pár disků tedy definuje vzorkovou komůrku s daným rozpětím pH při frakcionaci. Jako příklad můžeme uvést komůrku ohraničenou „ZOOM disky“ o pH 3,0 a pH 4,6, kde se budou shromažďovat při fokusaci proteiny, jejichž izoelektrický bod bude v rozmezí 3,0 až 4,6. Frakcionátor je tvořen těmito vzorkovými komůrkami řazenými za sebou ukončenými na jedné straně rezervoárem s katodovým a na druhé s anodovým pufrem. Jedna vzorková komůrka má objem 650 μ L. K dispozici je 8 „ZOOM disků“ o daném pH 3,0, 4,6, 5,4, 6,2, 7,0, 9,1, 10,0 a 12,1. Tyto disky lze volně kombinovat dle požadovaného rozmezí pH, vynechané disky jsou pak nahrazeny přiloženými *spacers*. Přes tuto variabilitu je nutné vždy spojit 7 komor systému. Ve standardním případě, který znázorňuje Obr.5a, šest disků vytváří 5 frakcí v rozmezí pH 3,0–10,0. V případě úzkého rozmezí pH, například pH 4,6–5,4, vybereme 4 disky a kombinujeme je se *spacery* (Obr.5b). Z uvedených příkladů je zřejmé, že disky pH 3,0 a 10,0, které jsou umístěny u rezervoárů s katodovým a anodovým pufrem, tak zamezují detekci proteinů, jejichž pI je nižší či vyšší. Tyto proteiny jsou při frakcionaci ztraceny. Je možné

vytvořit i rozšířený systém, který zvýší detekční rozsah na pH 12 (**Obr.5c**), kde 3 disky umožní vytvoření 2 frakcí o pH 3,0-9,1 a pH 9,1-12,0.

Standardní průběh frakcionace trvá 3 hodiny v rozmezí 100-600 V. Pokud vzorek obsahuje větší koncentraci bílkovin, či je vyšší koncentrace solí, pak se prodlužuje doba frakcionace. Výrobce navíc doporučuje po ukončení frakcionace a vysátí frakcí s komůrek ještě komůrky jednou promýt, protože se udává, že až 20% proteinů může být ještě navázáno na membránu disků.

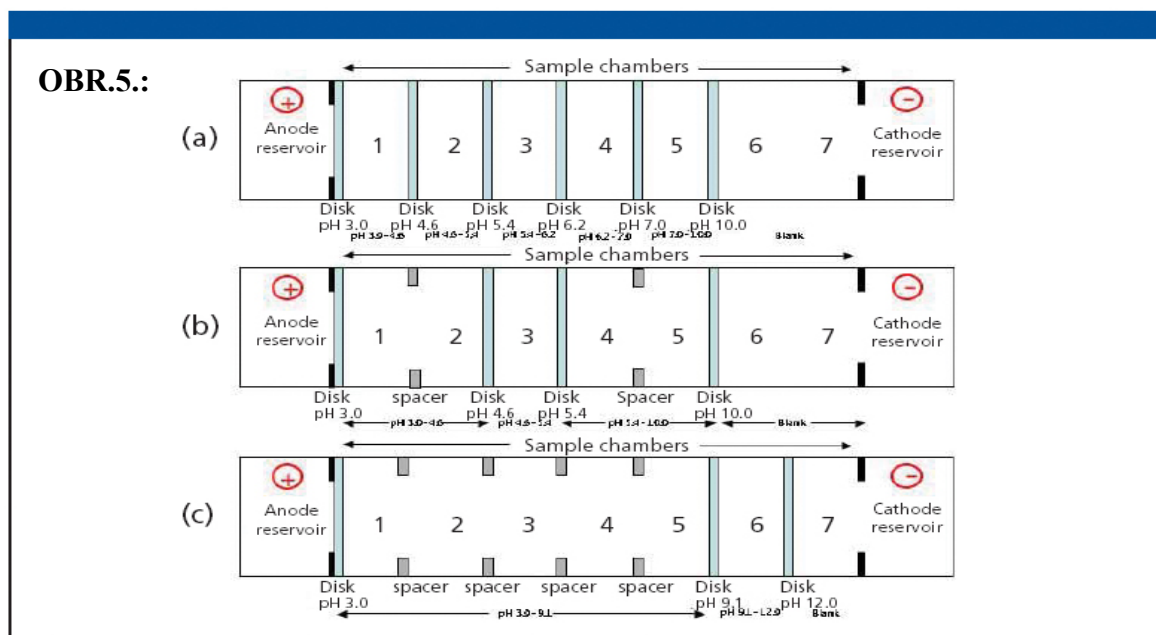


Figure 3: Formats for the Invitrogen Zoom IEF Fractionator: (a) standard format, in which six disks are used to create five fractions from pH 3.0 to pH 10.0; (b) extended format in which seven disks are used to create six fractions from pH 3.0 to pH 12.0; and (c) three-disk extended format in which three disks are used to create two fractions, pH 3.0–9.21 and pH 9.1–12.0.

2.5.2.4. Digital ProteinChip (dPC)

„Digital ProteinChip“ (dPC) je recentně vyvinutý systém společností Protein Forest, Inc. (Lexington, Massachusetts) využitelný jako paralelní IEF pro rychlou frakcionaci a obohacování proteinových směsí (Zilberstein, Korol *et al.* 2004, Zilberstein, Baskin *et al.* 2004). Čip obsahuje lineární pole s 41 gelovými místy (rozlišení mezi místy je 0,05 jednotek pH). Čipy jsou dělány roboticky a jsou dostupná tato rozmezí pH: 4,20-6,20, 6,00-8,00 a 7,20-9,20. Do dPC fractionátoru lze umístit až 6 čipů a doba frakcionace se pohybuje mezi 30-45 minutami. Standardně se nanáší 50 μ l vzorku obsahujícího 20-100 μ g proteinů. Maximální kapacita je 2 mg proteinů. Po ukončení frakcionace lze proteiny získat například pomocí metody *western blot* či přímým štěpením na čipu následovaným LC-MS. Výrobce demonstruje 92%

reproducibilitu množství proteinů získaného z buněčného lyzátu pomocí frakcionace s doprovodnou LC-MS ve srovnání pouze s LC-MS detekcí.

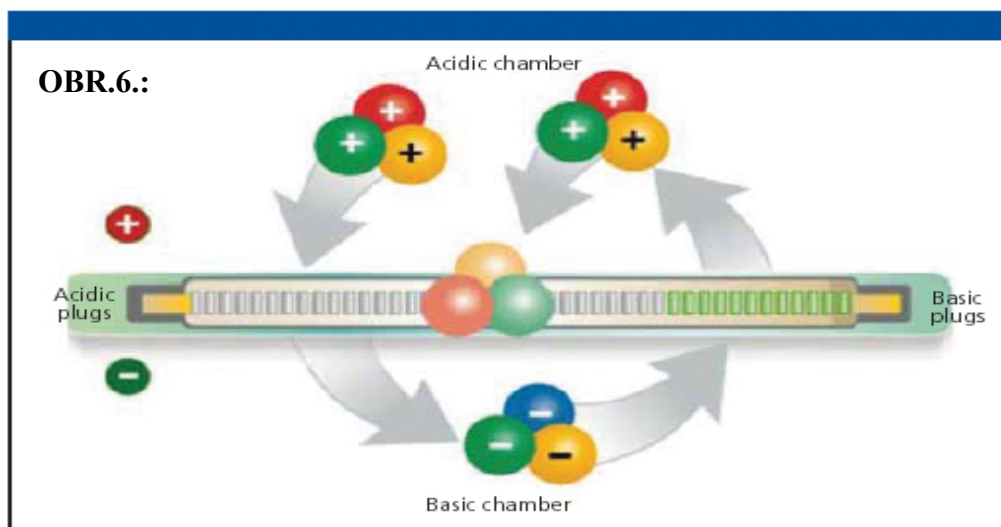


Figure 4: Fractionation principle of the Protein Forest digital ProteinChip. Charged polypeptides migrate through the chip between the acidic and basic sides until they encounter a gel plug whose pH is at or near their pI. The uncharged polypeptide will no longer migrate and becomes "trapped" in these plugs.

2.6. Membránový proteom

Buněčná signalizace je komplexní děj, kterým organismus-buňka odpovídá na vnější stimuly a je tak schopna udržet přesnou kontrolu nad různými procesy, vyskytujícími se v či mezi buňkami. Signální dráhy regulují procesy jako transkripci, translaci, proliferaci, apoptózu, diferenciaci, metabolismus či životaschopnost (Koshland 1993, Maruyama *et al.* 2008). Změna či defekt v této dráze může vyústit v různé abnormality (nemoci vlivem např. autoimunitní reakce, nekontrolovatelné proliferace či ztráty apoptotické odpovědi buňky). Je zřejmé, že pochopení role plasmatických membránových (PM) proteinů, které hrají důležitou úlohu v buněčné signalizaci, je nezbytné.

Plazmatická membrána spolu s proteiny je první bariérou proti vnějšímu prostředí a musí efektivně, rychle a adekvátně reagovat na změny a signální látky, které se v prostředí vyskytují. PM proteiny mohou být integrální, transmembránové nebo pouze ukotvené k membráně hydrofobní doménou. Mají nespočet funkcí jako receptory pro endogenní či exogenní ligandy, tvoří kanály nebo póry pro živiny či

nízkomolekulární látky a hrají důležitou roli při rozpoznávání či adhezi molekul (Kabbani 2008).

Složení membránového proteomu kolísá v průběhu buněčné diferenciaci a také při defektu (nemoci). Membránové proteiny se tak zdají být důležitým *biomarkerem* při prognóze a vývoji onemocnění a mohou být důležitým cílem pro terapeutika pro blokaci signálních kaskád při patogenezi (Gloriam *et al.* 2009, Halai a Craik 2009, Zhang *et al.* 2007, Topiol a Sabio 2009). Identifikace a charakterizace PM proteinů s následným přiřazením funkce je tedy nezbytná pro vytvoření modelu molekulární struktury signalizace.

Mnoho PM proteinů obsahuje transmembránové domény s hydrofilními a hydrofobními částmi. Tato dualita je zodpovědná za specifitu těchto proteinů a zároveň způsobuje komplikace při jejich analýze. Před vlastní proteinovou analýzou jsou proto velmi důležitými kroky:

- *obohacení vzorku PM a jeho purifikace;*
- *důsledná solubilizace vzorku;*
- *separace, identifikace a charakterizace membránových proteinů.*

Všechny zmíněné kroky jsou nezbytné pro správný experimentální postup a následnou interpretaci výsledků.

2.6.1. Specifika cytoplazmatické membrány u bakterií

Cytoplazmatická membrána, která kompletně odděluje vnitřní prostředí buňky od okolního prostředí, je velmi tenká, přibližně 8 nm a tvoří 10–26% suché hmotnosti bakterie. Na rozdíl od eukaryotických buněk je jedinou membránovou strukturou bakterií a proto jsou na ní lokalizovány všechny buněčné funkce a děje, které probíhají na membránových strukturách.

Základem cytoplazmatické membrány je dvojvrstva fosfolipidů, kde polární hydrofilní hlavičky fosfolipidů jsou směřovány do vodného prostředí a hydrofobní část, kterou tvoří mastné kyseliny, je orientována dovnitř proti sobě. Toto strukturní uspořádání membrány vychází z představ Singera a Nicholsona (1972) a je nazýváno **modelem tekuté mozaiky**.

Membrána je pevnou, ale zároveň také pružnou až tekutou strukturou. Fosfolipidy i proteiny nejsou statickou součástí membrány, ale mohou se volně pohybovat v rámci dvojvrstvy. Tato dynamika je důležitá při utváření strukturních i

funkčních vazeb mezi jednotlivými enzymovými komponentami. Celková struktura cytoplazmatické membrány je stabilizována pomocí vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí. Na stabilizaci této struktury se také podílí kationty jako Mg^{2+} a Ca^{2+} v kombinaci s negativními náboji fosfolipidů.

Konkrétní chemické složení bakteriální membrány závisí na druhu bakterie a podmínkách vnějšího prostředí (Card 1973, Herendeen *et al.* 1979). Bílkoviny tvoří přibližně 70% a lipidy 30% hmotnosti membrány. Membránové bílkoviny tvoří 10–20% proteinů celé bakteriální buňky. Glykoproteiny se vyskytují v bakteriální membráně jen výjimečně.

2.6.2. Metody separace membránových bílkovin a jejich purifikace

Získání dostatečného množství vzorku plazmatických membrán (PM) v odpovídající kvalitě patří mezi nejkritičtější části experimentu. Velkým problémem je kontaminace cytoplazmatickými proteiny či bílkovinami z jiných organel. K úspěšné přípravě vzorku se využívají následující metody:

- *Chemická precipitace* či *hustotní gradientová ultra-centrifugace*: vytvoření sub-frakcí (sub-proteomů) vede ke snížení komplexity vzorku a tím i zvýraznění málo zastoupených proteinů ve vzorku a jejich identifikaci (Josic *et al.* 2005, Lawson *et al.* 2006, Stasyk a Huber 2004, Righetti *et al.* 2005, Roy *et al.* 2007). Při chemické precipitaci se využívá toho, že jsou zastoupeny 2 fáze, kde rozdělení do fází probíhá na základě hydrofobicity (používá se např. dextran T-500 či PEG 3350), (Cao *et al.* 2006, Schindler *et al.* 2006, Srivastava *et al.* 2005). Při hustotní gradientové centrifugaci se zase využívá rozdílné hustoty dělených partikulí. Zhang a kol. aplikoval sacharózovou hustotní gradientovou centrifugaci pro izolaci PM frakcí z myších jater a identifikoval 88 (50%) integrálních membránových proteinů (IMP) z celkového počtu 175 proteinů (Zhang *et al.* 2005). Vyšší purifikace plazmatických bílkovin lze také dosáhnout přidavným krokem, v němž se zvýší pH prostředí, nebo zvýšením koncentrace solí (Fujiki *et al.* 1982). Nicméně se ukazuje, že i při použití těchto účinných metod, dochází ke kontaminaci vzorku a následným problémům při srovnávání dvou bílkovinných profilů z nezávislých preparátů. Při studiu eukaryotního fosfoproteomu se velmi osvědčila extrakce uhličitánem

sodným v kombinaci se sacharózovou centrifugací (Thingholm et al. 2008). Získané dobré výsledky ukázaly, že není nutné se vždy snažit o získání ultra čisté membránové frakce, zvláště při funkčních analýzách.

- „*Cross-linking*“ membránových proteinů do komplexů – zesíťování membránových bílkovin pomocí „cross-linking“ reagentu do komplexů a jejich následná purifikace pomocí chromatografie či „imunoprecipitace“ (Weerasekera et al. 2007).
- *Buněčné „holení“* („cell shaving“) – v proteomice se objevil další přístup ke studiu PM, kdy jsou identifikovány a poměrově kvantifikovány membránové proteiny exponované na povrchu buňky. Tyto proteiny jsou uvolněny pomocí proteáz přítomných v roztoku s intaktní buňkou. Získaná směs je pak identifikována pomocí MS/MS. Teoreticky je tato metoda výhodná při studiu topologie buňky (epitopy exponované na povrchu a schopné interagovat s jinými povrchovými molekulami, živinami či cizími částicemi). Při této metodě také odpadá proces solubilizace vysoce hydrofobních proteinů. Bohužel v praxi je často problémem stabilita buněk při působení proteáz a následné centrifugaci. Tedy na konci procesu dochází k vysoké kontaminaci vzorku cytozolickými proteiny. Nicméně se zdá, že by tento přístup mohl být zvláště vhodný pro bakteriální systémy (hlavně Gram-pozitivní (Rodriguez-Ortega et al. 2006, Tjalsma et al. 2008)).
- „*Biotinylace*“ a „*imunoprecipitace*“ – dalším vhodným přístupem je „biotinylace“ membránových bílkovin na aminokyselinových zbytcích lokalizovaných ve vnějších doménách a jejich následné vychytání pomocí magnetických streptavidinových kuliček (Zhang et al. 2003, Elia 2008 a Zhao et al. 2004). Nevýhodou této metody je použití pouze na rostoucích buňkách v kultuře. Pokud chceme studovat membránové proteiny i na vzorcích tkání, je vhodné využít „imunoprecipitaci“. Tento přístup využil Chang a kol. s protilátkami proti CD15 s navázanými super-paramagnetickými kuličkami při purifikaci PM z lidských neutrofilů (Chang et al. 2004). V roce 2006 něco podobného zopakoval Lawson a kol. při separaci membránových bílkovin z potkaních jater (Lawson et al. 2006).
- *Glykoproteomika* jako základ při purifikaci membránových proteinů – membránové bílkoviny často tvoří komplexy s glykany a to především přes asparagin (N). Metody založené na analýze N-vázaných glykoproteinů jsou vysoce vhodné při obohacování membránových proteinů. Tradiční přístup při

glykoproteinové purifikaci spočívá ve využití afinity k lektinu (Kullolli et al. 2008). Modernější způsob využívá hydrazinové skupiny, které vzniknou v proteinové směsi po přidavku jodistanu sodného. Vzniklé aldehydové skupiny se pak vážou na ukotvený hydrazin. Po odmytí neglykosylovaných proteinů se provádí trypsinace a odmytí dalších neglykosylovaných proteinů. V posledním kroku dochází pomocí N-glykosylázy F (PNGáze F) k odstranění glykopeptidů. Glykan zůstává navázan na hydrazin (Zhang et al. 2003). Tohoto přístupu bylo využito například ve studii Chena (2009), kdy byl vytvořen lidský jaterní glykoproteom a bylo identifikováno přes 900 glykosylovaných míst. Glykoproteomika se tak brzy stane účinným nástrojem i pro identifikaci membránových bílkovin.

2.7. Proteomové projekty

2.7.1. Studium bakteriální membrány *Bacillus subtilis* 168_{trp2}- dlouhodobě vystaveného pH stresu

Bakterie jsou, jako typicky jednobuněčné organizmy, vystaveny vnějšímu prostředí celým svým povrchem. Proto v nich vyvolává kolísání teploty, pH, osmolarity a dalších faktorů prostředí, okamžité fyziologické změny, často ohrožující přežití. Rozpor mezi podmínkou stálého vnitřního prostředí a proměnlivostí okolí řeší prokaryotní buňka koordinovanou expresí genů, jejichž produkty obnovují homeostázi porušenou stresem a minimalizují tak vzniklá poškození. Skupiny genů, synchronně aktivované změnou prostředí a podléhající společné kontrole, jsou označovány jako globální regulony (VanBogelen *et al.* 1987). Jednotlivé regulony jsou navzájem propojeny regulačními i funkčními vazbami a vytvářejí tak globální regulační síť (VanBogelen *et al.* 1999).

Studium globálních regulonů urychlilo v 80. letech 20. století právě zavedení dvojrozměrné elektroforézy. Tato technika s unikátní separační schopností a citlivostí se stala základem proteinových analýz. Spojené úsilí proteomiky a funkční genomiky vyústilo ve zmapování rozsáhlých globálních regulonů podílejících se na adaptaci bakteriální buňky na řadu stresů (van Schaik *et al.* 2004, Atalla a Schumann 2003, Polyakova *et al.* 2005). Geny i proteiny jednotlivých stresových regulonů indukovaných

např. teplotou, osmolaritou, etanolem či pH se částečně překrývají; tyto „průnikové“ proteiny s širokým reparačním účinkem jsou označovány jako obecné stresové proteiny (General Stress Proteins - **GSP**) (Visick a Clarke 1995, Hecker a Volker 2001). Integrací stresových signálů a překryvem adaptivních odpovědí tak v buňce vzniká systém víceúrovňového jištění při zátěžové situaci (Holtmann a Bremer 2004). Primární sekvence stresových proteinů prokaryot a eukaryot vykazují významný stupeň homologie (Carrascosa *et al.* 2001). Studium stresových odpovědí v bakteriích tak přesahuje rámec mikrobiologie a získané výsledky přispívají k chápání obecných biologických principů.

Samostatnou kapitolu ve výzkumu stresových odpovědí představují procesy vedoucí k adaptaci cytoplazmatické membrány. Na funkci membrány, a tedy na její struktuře, závisí plynulá výměna hmoty, energie a informace mezi buňkou a prostředím. Proto nepřekvapuje, že je cílovým místem výkonných regulačních mechanismů a těší se oprávněné pozornosti badatelů. Maximum zájmu se soustřeďuje na fosfolipidovou matrix membrány, která představuje atraktivní průnikové téma biologie, chemie a biofyziky. Díky tomuto mezioborovému přístupu byly popsány v hrubých rysech adaptivní procesy, jimiž cytoplazmatická membrána při stresu prochází. K nejlépe prostudovaným patří termoregulace, která udržuje membránu funkční v širokém rozmezí růstových teplot (Shinitzki a Barenholz 1974, Svobodová *et al.* 1988).

B. subtilis 168 *trp*₂ (databáze TIGR) je pro tento typ výzkumu atraktivním modelem; jeho přirozeným prostředím je svrchní vrstva půdy, tedy biotop s extrémními výkyvy parametrů fyzikálních, chemických i biologických. Lze předpokládat, že bakterie schopná trvalé existence v takovýchto podmínkách, disponuje účinnými adaptivními mechanismy, např. zastavením růstu, kterým reaguje *B. subtilis* na chladový šok (ochlazení ze 40 na 20°C), který pak bakterie překonává v komplexním médiu za hodinu, v minimálním médiu podstatně pomaleji, za tři hodiny (Svobodová *et al.* 1988). Cílem teplotních regulací při chladovém šoku je syntéza mastných kyselin i polárních hlav fosfolipidů (Grau *et al.* 1994), výstupem těchto změn je modulace strukturních a dynamických parametrů biomembrány jako podmínky pro zachování membránových funkcí (Toptygin *et al.* 1992, Heřman *et al.* 1994, Konopásek *et al.* 2000, Miethke *et al.* 2006). Podobně jako na chladový stres, reaguje cytoplazmatická membrána *B. subtilis* i na změnu pH, osmolarity a přítomnosti detergentů. (Petráčková

2003, Šemberová 2002). Převážná část prací, které se adaptací membrán zabývají, se orientuje na vztah mezi lipidovým složením membrány a jejími fyzikálními vlastnostmi.

Mnohem méně pozornosti bylo dosud věnováno bílkovinám membránového kompartmentu, přestože výrazně modulují jak fyzikální vlastnosti membrány, tak její fyziologickou výkonnost a představují 70% hmotnosti membránové struktury. Informace o proteomu cytoplazmatické membrány bakterie jsou neúplné. Důvodem, proč zůstávají bílkoviny bakteriální membrány mimo zorné pole badatelů jsou jistá metodická omezení běžně užívaných rutinních 2-DE proteomových technik (Bunai a Yamane 2005). Ty nezachycují např. proteiny s větším počtem transmembránových domén, ani proteiny charakterizované pI v alkalické oblasti, mezi něž značná část membránových proteinů náleží (Büttner *et al.* 2001). Další práce těchto autorů (Eymann *et al.* 2004) přináší dělení proteinů cytoplazmatické membrány *B. subtilis* kultivované v minerálním médiu metodou 1-DE a kombinuje ji s analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. Z našich analýz, vycházejících rovněž z 1-DE, tedy z metody s nepříliš vysokou rozlišovací schopností vyplynulo, že v porovnání s kultivací v optimálních podmínkách, mění *B. subtilis* obraz bílkovin cytoplazmatické membrány, je-li kultivován s etanolem či v kyselém pH (Šemberová 2002, Petráčková 2003).

2.7.2. Srovnávací proteomová studie adaptace populace *Escherichia coli* rezistentní k erytromycinu při kontinuální kultivaci v nelimitovaném chemostatu v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika

2.7.2.1. Rezistence k antibiotikům

Podle stávajících modelů vzniká získaná rezistence vůči antibiotikům v důsledku mutací dědičné informace mikroorganismů, případně za určitých okolností jde o horizontální přenos genetické informace mezi organismy. Odolnost vůči antibiotiku získá pouze malé množství jedinců z celé populace bakterií a navíc mohou svého hostitele i znevýhodňovat. Nicméně pod selekčním tlakem antibiotika se začne jednat o evoluční výhodu, kdy přežívají pouze jedinci s vhodným genem. Z genetického hlediska však prochází tato populace výraznou redukcí četnosti a dramaticky tak klesá její

diverzita. Výsledná populace může být sice stejně početná jako původní, ale průchod tzv. „hrdlem láhve“ ji geneticky homogenizuje.

Zajímavý je proto objev pracovní skupiny Profesora Collinse (Lee *et al.* 2010), která v roce 2010 popsala, že i pod selekčním tlakem antibiotika norfloxacin (vliv na DNA replikaci) bylo pouze 1% všech bakterií *Escherichia coli* rezistentních. Ukázalo se, že rezistentní bakterie mají extrémně vysokou expresi genu pro tryptofanázu, která rozkládá tryptofan a produktem je mimo jiné i indol. Je známo, že indol produkují i jiné bakterie za stresových podmínek (Hirakawa *et al.* 2005, Lee a Lee 2010). V tomto případě zajišťoval rezistenci dvěma způsoby, usnadňoval vylučování antibiotika z buňky a napomáhal eliminaci volných radikálů. Producenti indolu vylučovali látku do okolí, aby byla přístupná i dalším jedincům v populaci.

Rozklad tryptofanu je pro samotnou bakterii zátěž a tak vykazuje paradoxně nejnižší životaschopnost. Z jejich strany jde o „altruistický“ akt ve prospěch nositelů shodné či podobné genetické informace (Youk a van Oudenaarden 2010). Ukazuje se tak, že jednotlivé bakterie mohou být méně rezistentní než je celá populace.

Objev antibiotické rezistence v alarmujícím počtu lidských patogenů stimuloval výzkum principů mikrobiální patogenity. Proteomika usnadňuje určení změn v organismech vedoucích k patogenitě a rezistenci k antibiotikům. Hlavní úloha proteomiky je pak v separaci a identifikaci proteinů zapojených v patologických procesech, které snad povedou k objevu nových léčebných postupů (Washburn a Yates 2000).

2.7.2.1.1. Rezistence k erytromycinu

Erytromycin inhibuje proteosyntézu v buňce, tím že blokuje funkci ribozómu. Váže se na 50S podjednotku a zastavuje proteosyntézu blokem přístupu nascentního peptidu do tunelu, kterým za normálních podmínek prochází nově vznikající polypeptid.

Erytromycinová rezistence u bakterie může být způsobena redukcí množství antibiotika v buňce, modifikací samotného antibiotika či modifikací ribozómu (např. mutací ribozomálního proteinu L4 a L22 (obklopující tunel pro RNA), (Weisblum 1995) nebo mutací 23S rRNA podjednotky, jenž tvoří proteinový východ z tunelu (Vester a Douthwaite 2001).

Genetické analýzy napovídají, že erytromycin rezistentní fenotyp asociuje se změnami L4 proteinu a může být modifikován mutací v malé podjednotce. (O'Connor *et*

al. 2004). Klinické izoláty makrolid-rezistentních stafylokoků byly popsány ve Francii, Japonsku a USA krátce po zavedení erytromycinu do klinické praxe v roce 1953. V současnosti je rezistence k erytromycinu nejčastěji připisována posttranskripční modifikaci 23S rRNA adenin-specifickou N-methyltransferázou specifikovanou třídou genů nesoucích jméno *erm* (*erythromycin r*ibosome *m*ethylation). V poslední dekádě bylo nalezeno a charakterizováno asi 30 *erm* genů z různých zdrojů (Weisblum 1995, Buriánková 2003).

Přesnost translace je mimo jiné ovlivněna také aminoglykozidickými antibiotiky a antibiotiky s cílem na 50S podjednotce, např. oxazolidiny, jenž stimulují přečtení STOP kodónu a posunové mutace během dekódování (O'Connor *et al.* 2004).

V posledních dvou dekádách dochází u řady patogenních bakterií k alarmujícímu vzrůstu rezistence na antibiotika díky jejich nadměrnému používání a nesprávnému dávkování. Řada bakteriálních populací rezistentních na antibiotika není, při odstranění antibiotika z media a dostatečně dlouhé době růstu, dominována revertujícími organizmy, které ztratí rezistenci, ale naopak je velmi často populace ovládnuta bakteriemi, které akumulují sekundární adaptivní mutace zvyšující jejich fyziologickou zdatnost a přitom si zachovávají rezistenci na antibiotika a často se u nich obnoví i jejich snížená virulence. Proteomika může výrazným způsobem pomoci k objasnění mechanismů řídících tyto procesy a tak výrazně přispět v boji proti masově se šířícím rezistencím k antibiotikům.

2.7.2.2. Kultivační systémy

Mikrobiální růst buněk bývá studován buď v tzv. „batch“ kultivaci (vsátková kultivace), nebo v kontinuální kultivaci. Obě techniky se v laboratorních podmínkách využívají podle vhodnosti pro daný experiment.

V experimentální „batch“ kultuře je sledována buď spotřeba substrátu nebo zvyšování koncentrace biomasy jako funkce času. Základní podstatou tohoto systému je, že se buněčné prostředí a tím i buněčné složení a fyziologický stav, během experimentu mění. Naproti tomu v kontinuální kultuře je rovnovážná koncentrace substrátu ustálena nezávisle na hustotě kultury a čase. To dovoluje udržet v rostoucí kultuře stálé podmínky prostředí a tím je kultura udržována ve stabilním fyziologickém stavu. Proto v ideálním případě při kontinuální kultivaci mohou být získána přesnější a statisticky významnější data než z „batch“ kultivace (Ogle a Ramakrishnan 2005).

Zařízení **chemostat** tvoří kultivační nádoba, která má vstupní otvor pro přítok sterilního media z rezervoáru a odtokový otvor, pro odtok media obohaceného o buněčný odpad i živé buňky. Název "chemostat" zavedli Novick a Szilard v roce 1950. V praxi je chemostat doplněn různými zařízeními pro aeraci kultury a ochranu před kontaminací. Odtok je často kontrolován prostřednictvím sifónu. Rychlost buněčného dělení v chemostatu může být měněna patřičnou úpravou rychlosti odtoku, ale rovnováhy bude dosaženo tehdy, když počet nově vzniklých buněk dělením bude přesně odpovídat počtu buněk v odtoku. Tato rovnováha je vymezena téměř výlučně koncentrací limitní živiny v rezervoáru. Změnou rychlosti průtoku se mění koncentrace základní živiny v kultivátoru a tím i rychlost množení buněk. (Dykhuizen a Hartl 1983).

Zařízení **turbidostat** udržuje konstantní turbiditu kultury prostřednictvím fotobuňky, která reguluje přítok živin negativní zpětnou vazbou (Bryson a Szybalski 1952). Regulačním činitelem je zde rychlost růstu kultury (měřená její turbiditou), podle které se řídí rychlost přítoku čerstvého prostředí. Při dosažení předem stanovené horní hranice hustoty buněk v kultivátoru kontrolované fotobuňkou, se zvýší rychlost přítoku a tím i úbytek buněk jejich vyplavením. Pokles hustoty buněk na určitou spodní hranici přivodí zastavení nebo zpomalení průtoku a tím i nárůst počtu buněk na původní hustotu. Všechny živiny jsou v nadbytku, žádná z nich není limitující jako i chemostatu.

Výhody kontinuální kultivace (chemostatu) ukazují i některé recentní studie, které využily tento typ kultivace ke zdůraznění změn v proteomech (Wick *et al.* 2001, Kolkman *et al.* 2004), či transkriptomech (Piper *et al.* 2002). Navíc pomocí kontinuální kultivace můžeme nahlížet i na funkce a mechanismus takových genů, které jsou zapojeny v procesech rezistence mikroorganismů (Hoskisson a Hobbs 2005).

2.7.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie

Leukémie není jedním onemocněním. Jde o skupinu nemocí s různou prognózou, které se projevují poruchou funkce kostní dřeně a krve. Existují 4 velké skupiny leukémií: akutní myeloidní leukémie (AML), chronická myeloidní leukémie (CML), akutní lymfoblastická leukémie (ALL) a chronická lymfatická leukémie (CLL). Uvnitř každé z těchto dvou skupin je řada subtypů, které se rozlišují podle charakteristik, jež příslušné maligní nezralé buňky nesou.

2.7.3.1. Leukémie v dětském věku

Leukémie tvoří 30% zhoubných nádorů v dětském věku a jsou tak nejčastější malignitou ve věkovém období 1-15 let. U dospívajících mezi 15-19 lety se s germinálními nádory dělí o druhé místo za maligními lymfomy. Nejčastějším typem leukémie a tím i nejčastější malignitou v dětském věku je **akutní lymfoblastická leukémie (ALL)**, která tvoří 80% všech leukémií a 25% dětských nádorů (Pui *et al.* 2008). Akutní myeloidní leukémie (AML) tvoří 15% leukémií, myelodysplastický syndrom (MDS) 5% a chronická myeloidní leukémie (CML) 2-3% leukémií.

2.7.3.2. Etiologie a patogeneze

Dětská ALL se svými biologickými vlastnostmi liší od ALL dospělých. Vrcholem výskytu je období mezi 2-5 lety života. Batolata a předškolní děti mají ve velké většině případů nalézány v leukemických buňkách charakteristické chromozomální změny – více než 50 chromozomů (Ito *et al.* 1999) nebo nález fúzního genu TEL/AML1, produktu nejčastější translokace nacházené u dětské ALL – t(12;21) (Zelent *et al.* 2004). Méně frekventované genetické translokace spojené se špatnou prognózou jsou reprezentovány přítomností fúzního genu BCR-ABL a MLL-AF4 (Pui *et al.* 2008).

Téměř všechny dětské leukémie charakterizují změny počtu a/nebo struktury chromozomů v nádorovém erytrocytu (Schultz *et al.* 2007), což je dokladem teorie vzniku dětské leukémie jako důsledku opakovaného poškození chromozomální výbavy normálního prekursoru lymfocyту, které počíná již v nitroděložním životě. Příčinou dalších chromozomálních změn mohou být běžné virové a bakteriální infekce.

Navíc leukemické buňky jsou samy závislé na hostiteli, takže u významného procenta pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií buňky podlehnou apoptóze a nekróze bezprostředně po převedení do podmínek *in vitro* (Ito *et al.* 1999, Nishii *et al.* 1999, Nishigaki *et al.* 1997). Faktory zodpovědné za přežívání leukemických buněk *in vivo* nejsou dosud známy. Publikovaná data ukazují supresivní efekt molekul přítomných v plazmě u dospělých akutních myeloidních leukémií na růst hematopoetických progenitorových buněk. Tento efekt byl potlačen protilátkami proti TNF alfa a adiponektinu (Iversen a Wiig 2005).

V současnosti jsou pokroky v oblasti molekulární medicíny významné a dávají naději na změnu léčebných postupů prostřednictvím ovlivňování buněčných pochodů souvisejících s nádorovým bujením. Příkladem této "cílené léčby" je preparát Glivec® (imatinib). Tento lék blokuje konstitučně vzniklou tyrozin-kinázovou aktivitu fúzního onkogenu BCR/ABL vazbou na ABL kinázu, jejímž důsledkem je inhibice schopnosti ABL přenášet fosfát k proteinům zajišťujícím přenos signálu v buňce. Buňka přestává proliferovat a podléhá buněčné smrti. Velké naděje vkládané do tohoto léku nové generace byly „přibrzděny“ poměrně rychle vznikající rezistencí u některých pacientů. Obecně se zatím nezdá reálné, že by chemoterapie byla v blízké budoucnosti zcela nahrazena cílenou léčbou.

2.7.3.3. Diagnóza

Stanovení správné diagnózy a přesného podtypu leukémie je hlavním prognostickým faktorem přispívajícím k úspěchu léčby. Obecně platí, že ve fenotypu ALL je nutné odlišit leukémii z prekursorů B lymfocytů (85% všech ALL) a T lymfocytů (15%) (Pui *et al.* 2008). T-ALL se léčí intenzivněji, má sklon k vzniku časných relapsů a leukemické infiltraci mozku. Klíčovým prognostickým faktorem je genotyp leukemické buňky. Některé podtypy leukémie (u dětí relativně vzácné), jako je například ALL s Filadelfským chromozomem (Ph1+ALL) či MLL+ALL (postihuje 80% kojenců s leukémií) mají nepříznivou prognózu a jsou léčeny podle velmi intenzivních schémat včetně transplantace kostní dřeně. V léčbě Ph1+ALL se v současnosti úspěšně uplatňuje Glivec® v kombinaci s chemoterapií. Situaci odběru dostatečného množství biologického materiálu pro výše uvedená vyšetření někdy komplikuje sklon dětských ALL k „suchým“ punkcím kostní dřeně, kdy se dostatek buněk získává jen obtížně. Nicméně přesné stanovení podtypu leukémie je imperativem a proto v České republice existuje systém referenčních laboratoří morfologie, průtokové cytometrie, cytogenetiky (hybridizace *in situ*) a molekulární genetiky, které provádí některá specializovaná vyšetření či potvrzují diagnózu „druhým čtením“.

Dalším významným prognostickým faktorem je časná odpověď na léčbu (obecně platné pravidlo v onkologii), kterou hodnotíme u ALL úbytkem blastů v periferní krvi po týdenním izolovaném podávání Prednisonu v kombinaci s jednou intratekální aplikací metotrexátu a mizením blastů z kostní dřeně, provedené za dva týdny od zahájení léčby. Remisi (klidové stadium nemoci s poklesem blastů v kostní

dření pod 5% a obnovením normální krvetvorby) dosahuje po měsíci léčby 99% dětí s ALL. Děti s pomalou redukcí nádorové masy (pomalí *respondeři*) tvoří u ALL relativně malou skupinu pacientů (cca 15%) se špatnou prognózou v důsledku zvýšeného rizika relapsů.

2.7.3.4. Léčba

Léčba dětské ALL je vedena podle protokolů, vyvíjených v mezinárodní spolupráci. Počátkem 60. let dvacátého století všechny děti s ALL zemřely, začátkem 21. století lze vyléčit 80% dětí. Léčba jen málokterého zhoubného onemocnění učinila takový pokrok. Je několik důvodů tohoto úspěchu. Dětská ALL je většinou mimořádně citlivá k chemoterapii podávané v kombinované podobě. Dětské pacienty postupují intenzivní formu léčby většinou bez výskytu *komorbidity* (současným výskytem dvou a více různých nemocí u jednoho pacienta), typické spíše pro starší pacienty. Tato intenzivní a plynulá léčba v prvních týdnech vede k účinné *eradikaci* (vymýcení) leukemických buněk a zabraňuje vývoji rezistentních mutant. *Relaps* (návrat onemocnění) leukémie postihuje 20% dětí. Jeho léčba je obtížná a u většiny dětí je indikována transplantace kostní dřeně od příbuzných i nepříbuzných dárců. Důsledkem další léčby je vyšší výskyt pozdních následků. Vyléčit se daří více než 30% dětí s relapsem.

2.7.3.5. Proteomický přístup při onemocněních krvetvorby

Výzkum maligních onemocnění krvetvorby na proteinové úrovni je důležitý, jak k zachycení molekulárních *markerů*, tak následně i k nalezení nových potencionálních terapeutických cílů. Navíc je velmi žádané doplnit poznatky o složení celkového proteomu získaného z buňky či tkáně o výsledky z proteinových *array* či z analýzy bílkovin pomocí hmotové spektrometrie.

Důležitost proteomiky jako metodického přístupu v hematologii byla ukázána již před několika lety v publikaci Rees-Unwina a kol. (2004). Neustále jsou vyvíjeny nové proteinové separační techniky, které zvyšují potenciál proteomiky jako takové (Ahmed 2009; Dakna *et al.* 2009) a zvláště je vidět velký rozvoj v metodách hmotové spektrometrie (Amoresano *et al.* 2009; Hu *et al.* 2009; Yates *et al.* 2009). Přesto tradiční gelově-separační techniky, které se uplatnily v hematologii při klasifikaci podtypů leukémie (Hanash *et al.* 2002), jsou stále aktuální (Westermeier a Schickle 2009).

Výsledky z 2-D elektroforézy přispěly k utřídění diagnostického „nepořádku“ u leukemických onemocnění (Maisnar *et al.* 2008) nebo byly využity při srovnávacích proteomických studiích leukemických nezralých buněk z kostní dřeně a z krve (Hutter *et al.* 2009).

I přes vysokou univerzálnost proteomických metod v přípravě vzorků či proteinové separaci, je nutné přihlédnout ke specifitě každého vzorku a o bílkovinách lidského séra či kostní dřeně to platí zvláště (Seferovic *et al.* 2008). Významné je především složení séra či kostní dřeně, kdy přibližně 12 bílkovin tvoří 90% všech proteinů séra a pouze malá část bílkovin, ta která obsahuje důležité *biomarkery*, je obtížně detegovatelná a kvantifikovatelná (Rees-Unwin *et al.* 2004). Pro zvýšení detekce je možné využít dvou přístupů, kdy jeden dovolí ze vzorku specificky odstranit majoritní bílkoviny a druhý pomocí tzv. „pre-fractionace“ rozdělí celý proteom na menší definované podskupiny (sub-proteomy) (Zolotarjova *et al.* 2005), (Seshi 2007), (Weiser *et al.* 2005). Tyto postupy zjednodušují složení vzorku a tím významně zvyšují celkový počet detegovatelných proteinů.

Jak bylo uvedeno výše, proteomický výzkum je velmi důležitý i v medicíně. A to jak ve farmakologii při studiu účinku léků na proteosyntézu, tak i v medicínském výzkumu ke studiu komplexních změn proteosyntézy u různých onemocněních, onkologii nevyjímaje (Alaiya *et al.* 2000).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané dizertační práce bylo využití gelově-založených proteomových technik k řešení tří nezávislých vědeckých projektů:

- Projekt zaměřený na adaptaci bakterie *Bacillus subtilis* na pH stres si kladl za cíl zavést optimální protokol pro separaci membránových a s membránou asociovaných proteinů a jejich následnou analýzu pomocí 2-DE. Dále bylo snahou získané membránové proteomy ze stresové a kontrolní situace porovnat a definovat tak vliv pH media na bílkovinnou složku cytoplazmatické membrány bakterie. Pro získání celkového obrazu adaptační strategie buňky byla proteomická data doplněna o výsledky měření charakterizující fyzikálně-chemický stav membrány bakterie při pH stresu.
- Srovnávací proteomová studie adaptace populace bakterie *Escherichia coli* rezistentní k erytromycinu si kladla za cíl detegovat proteinové změny v průběhu kontinuální kultivace *E. coli* v přítomnosti a nepřítomnosti subletální koncentrace antibiotika související s vývojem rezistence k tomuto antibiotiku. Dále pak přizpůsobit počítačové statistické vyhodnocení výsledků očekávanému množství získaných dat.
- Projekt studující akutní dětskou leukémii (ALL) si kladl za cíl najít kandidátní proteiny jako společné *biomarkery* pro včasnou diagnostiku nemoci. Hlavním cílem použití proteomových srovnávacích metod bylo najít a identifikovat bílkovinné změny mezi porovnávanými skupinami, tj. mezi souborem nemocných s ALL a kontrolní skupinou. Z metodického hlediska pak cílem bylo nalézt a aplikovat techniky úpravy nehomogenních vzorků typu krevního séra, které umožňují jejich následné efektivní dělení pomocí 2-D elektroforézy.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Biologický materiál

Při vypracovávání dizertační práce byly používány dva druhy bakterií *Bacillus subtilis* 168 *trp*₂ a *Escherichia coli*, dále výchozím materiálem byla kostní plazma (KP) od dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL).

4.1.1. *Bacillus subtilis*

Rod *Bacillus* je řazen do 13. skupiny Bergeyova systému (1984 – 89), tj. mezi tyčinky a koky tvořící endospory. Je to gram-pozitivní, aerobní a nepatogenní půdní bakterie (Hensyl 1994). Bakterie rodu *Bacillus* mají tvar rovných tyček o velikosti cca 0,5-2,5 x 1,2-10 µm, jsou obvykle motilní. Charakteristická je tvorba většinou oválných endospor, které jsou rezistentní vůči různým nepříznivým podmínkám (vysoká teplota, dehydratace, ozáření), (Harwood a Archibald 1990).

Bacillus subtilis se vyznačuje relativně velmi skromnými požadavky na růstové podmínky. Z hlediska nároků na pH je řazen mezi neutrofilní mikroorganismy (Krulwich *et al.* 1985). Teplotní optimum používaného kmene je 45 °C (mezofilní).

Pro účel pokusů byl bakteriální kmen přechováván na živném agaru č.2 (Imuna n.p.) v lednici při teplotě 6 °C a chráněn parafilmem před vyschnutím. Jednou za 3 měsíce byl přeočkován. Před každým pokusem byl přeočkován na čerstvý šikmý agar a kultivován 16 hodin v termostatu při 40 °C.

4.1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gram-negativní, fakultativní anaerobní a nesporulující bakterie žijící v tlustém střevě teplokrevných živočichů. Je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů ve střevě. Buňky jsou asi 2 µm dlouhé a 0,5 µm v průměru. *E. coli* je důležitým modelovým organismem v genetice a mikrobiologii, je hojně využívána v biotechnologiích pro svoji relativní jednoduchost, např. pro ukládání a konzervování požadovaných úseků DNA, přenos rekombinantní DNA pomocí konjugace do jiných organismů a jiné.

V našich experimentech jsme používali kmen *E.coli* s envA mutací (Normark 1969), která způsobuje zvýšenou permeabilitu buněčné stěny pro makrolidy a jiná antibiotika. Genotyp kmene byl **UR172-F'23-5Δ**(lac-proB), ara, argE(UAG), nalA, rpoB, thi, envA:: Tn 10, TetR, EryR (Andersson *et al.* 1986) a kmen byl získán od Dr. S. Anderssona, University of Uppsala, Švédsko.

Důležitým parametrem bakterie je rezistence k erytromycinu, která je založena na modifikaci cílového místa na ribozómu, konkrétně proteinu L4.

4.1.3. Kostní plazma

Klinika dětské hematologie a onkologie (2.LF UK a FN v Motole, Praha) poskytla ze své banky kostní plazmu dětí s ALL (akutní lymfoblastická leukémie), tedy vzorky leukemické kostní plazmy (LKP) a kontrolní vzorky kostní plazmy (KKP), které jsou od pacientů bez maligního onemocnění více než 1 rok po transplantaci kostní dřeně. Všechny vzorky byly získány po informovaném souhlase od pacientů z Kliniky dětské hematologie a onkologie. Získání skutečných kontrolních vzorků od zdravých dětských jedinců z pochopitelných důvodů nebylo reálné.

4.2. Kultivační půdy

4.2.1. Šikmý agar pro uchování *B. subtilis*

Agar byl připraven rozpuštěním 17,5 g živného agaru č.2 (Imuna n.p.) do 500 ml destilované vody na konečnou koncentraci 4% (w/v). Úprava pH na 7,0 byla provedena 1 M NaOH, nebo 1 M HCl. Agar byl rozplněn po 8 ml do zkumavek, sterilizován a poté uložen do šikmé polohy.

4.2.2. Komplexní kultivační medium pro růst *B. subtilis*

Komplexní kultivační medium bylo připraveno ze 3 složek (A, B, C) a pufru. Složky A, B a C byly odděleně rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a sterilizovány. Po vychladnutí byly asepticky slity a doplněny do 500 ml sterilní destilovanou vodou a přidáno 500 ml pufru o požadovaném pH. Doplnující úprava pH byla provedena dle potřeby 1 M NaOH, nebo 1 M HCl.

- **Složka A:** „Bacto beef extract“ (Oxoid): 1,50 g; „Bacto yeast extract“ (Oxoid): 1,50 g; NaCl: 3,50 g
- **Složka B:** „Bactopepton“: 5,00 g
- **Složka C:** glukóza: 5,00 gdoplnit do 500 ml destilované vody.
- **Pufrační složka dle požadovaného pH:** 500 ml

4.2.3. Pufry

Ve všech kultivačních médiích byl použit fosfátový pufr, který byl připraven podle Keila a Šormové (1959).

Fosfátový pufr (pH 5,5 – 8,0):

0,2 M KH_2PO_427,4 g/ 1000 ml

0,2 M K_2HPO_434,8 g/ 1000 ml

Podle požadovaného pH byly dle výše uvedeného předpisu smíchány v daném poměru obě složky pufru a doplněny na požadovaný objem destilovanou vodou. Finální koncentrace pufru byla 0,025 M. Pufry byly připraveny dvojnásobně koncentrované, aby po slití se složkami A, B, C, bylo dosaženo cílové molarity roztoku. pH připravovaných médií bylo ověřeno pH-metrem.

4.2.4. Kultivační medium pro růst *E. coli* (M9)

Minimální kultivační médium pro *E. coli* (**M9 médium**) bylo smícháno ze složek:

- Na_2HPO_46 g
- NaH_2PO_43 g
- NaCl 0,5 g
- NH_4Cl 1,0 g ...přidáno 500 ml destil. vody, úprava na pH 7,4 a sterilizace.

Po následné sterilizaci byli přidány k tohoto základu ještě další sterilní složky dle následujícího předpisu:

- 1M CaCl_21 ml
- 1M MgSO_4 2 ml
- 20% glukóza.....50 ml
- 10% (kaseinový hydrolyzát)....100 ml..... doplnit pak do 1000 ml destil. vodou.

Přídavek antibiotik (Sigma-Aldrich), zakoupená antibiotika byla do požadované koncentrace rozpouštěna v etanolu:

- *Chloramfenikol* – zásobní roztok: 60 mg/ml, finál. koncentrace byla 30 µg/ml;
- *Tetracyklin* - zásobní roztok: 15 mg/ml, finál. koncentrace byla 15 µg/ml;
- *Erytromycin* - zásobní roztok: 50 mg/ml, finál. koncentrace byla 50 µg/ml.

4.3. Technické zázemí

- **Sterilizace** - kultivační media a živné půdy byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při přetlaku vodní páry 0,15 MPa. Laboratorní sklo a pipety byly sterilizovány v horkovzdušné sušárně 1 hodinu při 160 °C.
- **Měření pH** - k měření pH kultivačních medií a k ověřování pH při kultivaci bylo použito pH-metru (většinou se jednalo o iontově selektivní skleněnou elektrodu). Před každým měřením byl pH-metr kalibrován ve standardních pufrch: ftalátový (pH = 4,0), fosfátový (pH = 7,0), borátový (pH = 9,0), (Sevafarma, Praha).
- **Měření teploty** – ke stanovení teploty kultivačních podmínek bylo použito rtuťového teploměru o rozsahu 0 – 50 °C s přesností 0,1 °C.

4.4. Chemikálie

Většina chemikálií použita v této práci byly od níže uvedených firem: GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Švédsko), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Serva (Heidelberg, Německo), BioRad (Hercules, CA, USA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Merck (Darmstadt, Německo), Pierce (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), Oxoid (součást Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK).

Chemikálie od jiných firem než výše neuvedených budou popsány přímo v textu.

4.5. Příprava vzorků

4.5.1. Kultivace *B. subtilis* a *E. coli*

Bakterie byly kultivovány aerobně v Erlenmayerových baňkách v rotační třepačce ve vodní lázni vytemperované na požadovanou teplotu nebo v horkovzdušné třepačce (např. Gallenkamp, Schoeller Instruments). Objem kultury byl volen tak, aby

dosahoval maximálně 2/10 objemu kultivační nádoby pro zajištění dostatečné aerace, rychlost třepání 170-220 rpm.

4.5.1.1. Růstová křivka *Bacillus subtilis*

Kultura *Bacillus subtilis* vyrostlá přes noc na šikmém agaru, byla přeočkována do tekutého komplexního media o požadovaném pH (**Kap.4.2.2.1.**) a kultivována v třepací lázni při teplotě 40 °C. Optická densita bakteriální suspence byla měřena na spektrofotometru SPEKOL 11 (10 mm kyvety) při vlnové délce 420 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Odběry byly prováděny v pravidelných časových intervalech 20 - 30 min podle typu pokusu. V okamžiku odběru byly bakterie usmrceny 50 µl formaldehydu (36 – 38%) a podle potřeby ředěny destilovanou vodou k měření O.D.

Dlouhodobá kultivace v pH 5,0 a 8,5 probíhala od čerstvě narostlé bakteriální kultury ze šikmého agaru o stejném pH jako následující kultivace. V exponenciální fázi byla kultura opět přeočkována a rozplněna do tří paralelních baněk (komplexní medium o pH 5,0, resp. 8,5). Růst byl sledován do konce exponenciální fáze růstu. Při izolaci membrán byl pokus ukončen při O.D._{420 nm} 0,500. Celková doba adaptace na pH 5,0, resp. 8,5 byla přibližně 20 hodin.

Do grafu byly vynášeny hodnoty $\log_2 (\text{O.D.}_{420\text{nm}} * 1000)$ v závislosti na čase t (min). Rychlostní růstová konstanta (c) a doba zdvojení bakterií (T) byla stanovena spojením experimentálních bodů v exponenciální oblasti růstové křivky. V exponenciální fázi je tato závislost lineární a směrnice přímky udává c (hod^{-1}), tj. počet generací za časovou jednotku. Její převrácená hodnota ($1/c$) udává dobu zdvojení bakterie T (hod), což je doba, za níž se počet buněk zdvojnásobí.

4.5.1.2. Kontinuální kultivace bakterie *Escherichia coli*

Kontinuální kultivace *E. coli* probíhala na principu nelimitovaného chemostatu (**Obr.7**). Přítok a odtok média byl regulován dle nárůstu kultury a kultura nebyla limitována žádnou živinou.

Aparatura na kontinuální kultivaci byla sestavena z ručně vyrobených skleněných kultivačních nádob o kultivačním objemu 50 ml. Kultivační nádobky byly dvě, ve kterých bylo možné souběžně kultivovat dva vzorky. Každá kultivační nádobka byla napojená na rezervoár media (5 L Erlenmayerova baňka) a vzdušnicí systém, který

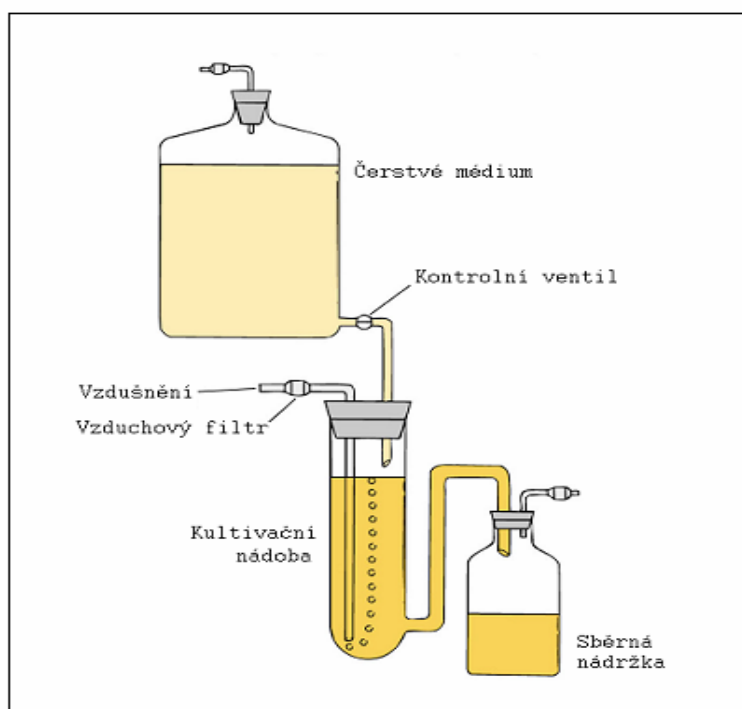
zároveň plnil funkci promíchávání. Zařízení bylo umístěno v temperované lázni na 37 °C po celou dobu provozu. Hnací silou systému byly dvě peristaltické pumpy (Obr.8).

Vlastní kultivace probíhala inokulací bakterie *E.coli* z inokula narostlého přes noc. Optická densita bakteriální suspence byla měřena na spektrofotometru Beckman (10 mm kyvety) při vlnové délce 600 nm. Po nárůstu kultury na O.D._{600 nm} 0,900 byl teprve spuštěn kultivační systém (přítok a odtok média) a snaha o udržení nárůstu bakterií na dané hodnotě. Podle naměřených hodnot O.D. byla regulována rychlost přítoku a tím i odtoku média do/z kultivační nádoby.

Po stabilizaci obou systémů – pokusného i kontrolního – byl započat vlastní experiment, který trval cca 120 hodin. V průběhu pokusu byly zaznamenávány hodnoty O.D. _{600 nm} (zákal kultury), nastavení peristaltických pump (rychlost přítoku), objemy vytékajícího média, sterilita systému a celkové kultivační podmínky. V průběhu experimentu byly v definovaných časech odebírány i sterilní vzorky bakterii, které posloužily jako inokula pro následující pokusy. Tyto vzorky byly uchovány ve 20% glycerolu při -80 °C.

Průběh celé kultivace byl vyneseno do grafu jako závislost absorpance na čase.

V našem případě byl sledován dlouhodobý vliv působení antibiotika erytromycinu na bakteriální kulturu *E. coli*. Další antibiotika jako chloramfenikol a tetracyklin byly do pokusu přidány z důvodu experimentálních (chloramfenikol - luciferázový gen, tetracyklin – mutace envA::Tn10). Pro další analýzy byly vybrány časy kultivace 43 hod, 68 hod a 103 hod.

OBR. 7.: Schéma kultivačního systému pro kontinuální kultivaci *E. coli*

Pro následující proteomické analýzy bylo potřeba namnožit vzorky bakterií z vybraných časů, jak bylo výše uvedeno. Následný růst bakterií *E. coli* probíhal na minimálním tekutém médiu M9, do kterého bylo navíc přidáno antibiotikum tetracyklin (koncentrace v mediu 15 $\mu\text{g/ml}$) a chloramfenikol (koncentrace v mediu 30 $\mu\text{g/ml}$). Navíc bylo přidáno i antibiotikum erytromycin (koncentrace v mediu 50 $\mu\text{g/ml}$), ale pouze k těm bakteriím, které byly i v průběhu kontinuální kultivace přítomnosti antibiotika vystaveny. Vzorky byly označeny jako K43h, K68h, K103h a E43h, E68h, E103h. Následná kultivace probíhala v horkovzdušné třepačce při 37 °C. Celková doba pokusu byla 6 hodin. V průběhu kultivace byly opět zaznamenávány hodnoty O.D._{600 nm} a vynášeny do grafu, kde byla podobně jako u *B. subtilis*, sledována doba zdvojení a růstová rychlost bakterie.

OBR. 8.: Fotografie reálného kultivačního systému pro kontinuální kultivaci

4.5.2. Zpracování vzorků kostní plazmy

Plazma z kostní dřeně typu LKP a KKP byla získaná po gradientové centrifugaci na vrstvě roztoku Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences) při 2200 rpm, 4 °C, po dobu 20 min. Následně byla plazma uchována pro další analýzy při -80 °C.

Z důvodu standardizace a dostatečného množství vzorku jsme přistoupili ke spojování vzorků, kdy 5 vzorků od pacientů postižených ALL charakterizovanou třemi hlavními genotypovými podtypy (hyperdiploidie, TEL-AML1, bez fúze a hyperdiploidie) a 5 vzorků z kontrolní skupiny (pacienti po úspěšné transplantaci kostní dřeně) bylo smícháno. Spojování vzorků umožnilo hledat množinu společných rozdílů mezi souborem pacientů a souborem kontrol, spíše než rozdíly mezi jednotlivými pacienty a jim neodpovídajícími kontrolami (**Kap.4.1.3.**). Následné analýzy byly provedeny z takto připravených směsných vzorků. Reprodukovatelnost výsledků byla ověřována na 3 nezávislých směsných vzorcích pacientů a kontrol.

4.6. Izolační metody

4.6.1. Izolace membránové frakce *B. subtilis*

K izolaci membránové frakce z buněk *B. subtilis*, kultivovaných za přesně definovaných podmínek, jsme použili enzymatickou metodu podle Bisschopa a Koningse (1976). Při tomto typu izolace membrán z bakteriálních buněk dochází v konečné fázi k tvorbě membránových váčků s proteiny orientovanými stejným směrem jako v buňce – dovnitř těchto váčků (angl. right side-in orientace). Velkou výhodou tohoto typu izolace je její rychlost, v jejímž průběhu je velmi nepravděpodobné, že dochází k dalším změnám membránové frakce buněk působením izolační procedury.

Enzymatická metoda podle Bisschopa a Koningse:

Použité roztoky:

Zásobní roztoky: 0,2 M K_2HPO_4 (w/v);

0,2 M KH_2PO_4 (w/v).

- 0,05 M fosfátový pufr: KH_2PO_4 – K_2HPO_4 (pH 8,0)
 - 94,7 ml A a 5,3 ml B, doplnit do 400 ml destilovanou vodou.
- 0,1 M fosfátový pufr: KH_2PO_4 – K_2HPO_4 (pH 6,6)
 - 37,5 ml A a 62,5 ml B, doplnit do 200 ml destilovanou vodou.
- 150 mM K^+ -EDTA (w/v).
- 0,5 M $MgSO_4$ (w/v).

Schéma pokusu:

- 1) Růst buněk v exponenciální fázi ($O.D._{420nm} = 0,500$) byl ukončen filtrací s použitím vodní vývěvy (filtry Pragopor č.5).
 - Filtrát buněk byl 3x promyt 50 mM fosfátovým pufrém (KH_2PO_4 – K_2HPO_4) pH 8,0 o stejné teplotě, v jaké probíhala kultivace (buňky na filtru nesmí vyschnout);
 - poté sediment resuspendován v 5 ml téhož pufru na koncentraci 4 mg vlhké váhy na 1 ml.

- 2) Přidat 50 μ l PMSF do 10 ml buněčné suspenze (roztok 100 mM phenylmethylsulfonyl-fluoridu (PMSF, Serva) v izopropanolu).
- 3) Přidat lysozym, deoxyribonukleázu I a ribonukleázu (Sigma-Aldrich) na konečné koncentrace 300, 10 a 10 μ g/ml a vše intenzivně promíchat.
- 4) Přidat 0,5 M MgSO_4 na konečnou koncentraci 10 mM.
- 5) Inkubace 30 min ve 40 °C .
- 6) Přidat K^+ -EDTA na konečnou koncentraci 15 mM.
- 7) Inkubace 1 min.
- 8) Přidat 0,5 M MgSO_4 na konečnou koncentraci 10 mM, za mírného třepání.
- 9) Centrifugace při 12 000 rpm po dobu 60 min na centrifuze Beckman (4 °C, vakuum, rotor SW 41, 25 000 g).
- 10) Získaný sediment resuspendovat v membránovém 0,1 M fosfátovém pufru (KH_2PO_4 – K_2HPO_4) o pH 6,6 na koncentraci 20 mg/ml a rozplnit do plastických mikrozkušavek po 100 μ l.
- 11) Vzorky byly uchovány při –78 °C v hlubokomrazícím boxu značky Heraeus.

4.6.2. Izolace celkové bílkovinné frakce *E. coli*

Příprava bílkovinného vzorku pro následující analýzy celkového proteomu bakterie *E. coli* byla velmi rychlá a jednoduchá.

Kultura *E. coli* narostlá do zákalu O.D._{600nm} 0,5 (v exponenciální fázi růstu) byla stočena, promyta a resuspendována ve fosfátovém či jiném vhodném pufru a následně přidána TCA (trichloroctová kyselina). Finální koncentrace TCA byla 12,5% (2 objemy vzorku a jeden díl 50% TCA). Inkubace probíhala 1 hodinu na ledu. Poté byl vzorek centrifugován (10 000g, 10 min, 4 °C), promyt 100% etanolem a pelet zamražen při -80 °C, případně uchován v acetonu při -20 °C.

4.6.3. Příprava vzorku kostní plazmy pro 2-DE analýzu

Získaný vzorek kostní plazmy již nebylo nutno dále zpracovávat z pohledu získání solubilních proteinů v roztoku. Nicméně složení kostní plazmy je velmi podobné krevní plazmě a velkou část tvoří pouze několik málo hojně zastoupených bílkovin. Tyto bílkoviny jsou pak velkým problémem při 2-DE analýze, protože

„zastiňují“ ostatní minoritní bílkoviny. Tento problém se řešil s využitím technik „imunodeplece“ a „pre-frakcionace“.

4.6.3.1. Odstranění majoritních bílkovin ze vzorku pomocí „imunodeplece“

Z „imunodeplečních“ technik byl vybrán systém „ProteomeLab IgY-12“ od firmy Beckman Coulter (Brea, CA, USA), který není v současnosti dostupný. Součástí sady byly centrifugační kolonky obsahují purifikované kuřecí protilátky, které jsou kovalentně konjugované s polymerními kuličkami. Protilátky by měli vázat 12 majoritních bílkovin, které se hojně vyskytují v lidské krevní plazmě jako jsou albumin, IgG, transferin, fibrinogen, IgA, $\alpha 2$ makroglobulin, IgM, $\alpha 1$ antitrypsin, haptoglobin, $\alpha 1$ glykoprotein, apolipoprotein A1, apolipoprotein A2. Tyto proteiny představují až 96% všech plazmatických proteinů, čímž činí identifikaci minoritních biologických *markerů* v plazmě obtížnou.

Kostní dřeň byla naředěna na koncentraci 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a dle manuálu byla „depletována“. Protože výtěžek z této kolonky byl malý, byl celý proces opakován 4krát, aby bylo dosaženo výtěžku kolem 200 μg , který byl dostačující na jednu 2-DE analýzu.

Vzorky byly po „depleci“ sráženy pomocí TCA (finální koncentrace 6%) a následně rozpuštěny ve vzorkovém pufru II (**Kap.4.8.1.**) a tak připraveny pro následující analýzu pomocí 2-DE.

4.6.3.2. Rozdělení vzorku pomocí „pre-frakcionace“

Na vzorcích kostní plazmy se zkoušela metoda „pre-frakcionace“ s cílem snížit komplexitu vzorku. Kostní dřeň byla pomocí přístroje ZOOM[®] IEF Fractionator (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA) rozdělena na principu izoelektrické fokusace obdobně jako při gelové elektroforéze, s tím rozdílem, že dělení probíhalo v roztoku (**Kap.2.5.2.3.**).

Frakcionátor je tvořen několika komůrkami oddělených membránami. V našem případě byl vzorek rozdělen na dílčí frakce v rozsahu pH 3-5,4; pH 5,4-6,2; pH 6,2-7,0 a pH 7,0-10,0. Po sestavení aparatury, bylo do jednotlivých komůrek přidáno 650 μl vzorku o koncentraci 0,5 mg/ml (proteiny byly rozpuštěny ve vzorkovém pufru II). Doba vlastní fokusace byla 3 hodiny při napětí 100 V (20 min), 200 V (80 min) a 600 V

(80 min). Po skončení frakcionace byly vzorky z jednotlivých komůrek odebrány. Dle návodu byly ještě jednotlivé komůrky propláchnuty, protože až 20% bílkovin zůstává navázáno na membrány. Takto získané roztoky byly přidány k příslušné původní frakci. Získané vzorky bylo nutné ještě zahustit pomocí srážení s TCA (finální koncentrace 6%). Uchování vzorků pak bylo možné ve formě pelet či ve vzorkovém pufru II při -78 °C. Podrobný manuál pro použití zařízení k frakcionaci je volně ke stažení na stránkách firmy Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>).

4.7. Stanovení koncentrace bílkovin

4.7.1. Stanovení koncentrace bílkovin pomocí BCA

Stanovení je založeno na reakci proteinů s měďnatými ionty, při kterém vznikají měďné ionty, které dále reagují s BCA (bicinchroninic acid) za vzniku barevného komplexu s vysokým molárním extinkčním koeficientem při 562 nm. Reakce je vysoce citlivá, specifická a toleruje přítomnost mnoha komponent různých pufrů, složek kultivačních medií nebo detergentů. Použité reakční činidlo je připraveno z produktů firmy Pierce (Termo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Koncentrace proteinů je odečítána ze standardní kalibrační křivky s BSA (Bovine Serum Albumin).

Použité roztoky:

- A)** 1% BCA (bicinchroninic acid) (w/v), 2% Na₂CO₃ · H₂O (w/v), 0,16% Na₂C₄H₄O₆ · 2H₂O (w/v), 0,4 % NaOH (w/v), 0,95 % NaHCO₃ (w/v); optimální pH = 11,25 (lze podle potřeby upravit 50% NaOH nebo pevným NaHCO₃);
- B)** 4% CuSO₄ · 5 H₂O (w/v).

Pracovní roztok: 50 objemů A + 1 objem B;

BSA (hovězí sérový albumin) o koncentraci 2 mg/ml (srovnávací standard proteinů).

Stanovení:

1 objem vzorku proteinů + 20 objemů pracovního roztoku

- inkubace 30 min při 37 °C
- ochlazení na pokojovou teplotu a měření absorbance při 562 nm.

Zkumavky s 10–15 µl vzorku membránových proteinů byly doplněny na 50 µl destilovanou H₂O. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml roztoku A + B (např. 10 ml A + 0,2 ml B). Blank byl zpracován jako vzorky, pouze místo vzorku membránových proteinů byla použita destilovaná voda.

Koncentrace bílkovin byla stanovena pomocí kalibrační přímky, která byla zpracována také jako vzorky, kde místo vzorku byl použit vodný roztok BSA o různých koncentracích.

4.7.2. Stanovení koncentrace bílkovin pomocí EZQ

Stanovení proteinů pomocí soupravy EZQ (EZQ[®] Protein Quantitation Kit, Invitrogen, Molecular Probes) bylo voleno z důvodu nízké koncentrace proteinů ve vzorcích z kostní plazmy. Výtěžek těchto vzorků byl po proběhlé „depleci“ tak malý, že bylo potřeba minimalizovat další ztráty a přesto bylo nutné znát koncentraci vzorků a nanášku na gely sjednotit.

Tento *kit* byl připraven právě pro vzorky, které budou analyzovány 2-DE a obsahují již detergenty, redukující látky či močovinu. Tyto součásti vzorku by při normálním stanovení koncentrace bílkovin spolu interferovaly, ale při využití tohoto systému na bázi fluorescenčního značení bílkovin, to není překážkou.

Mezi velké výhody systému patří rychlost stanovení, která se pohybuje kolem 1 hod, objem proteinů je v řádu µl a na jeden nanášecí papír je možné nanést až 96 vzorků včetně standardů.

Hotové proteinové *assay* byly odečítány na spektrofluorometru Molecular Imager FX (BioRad). Koncentrace bílkovin byla stanovena pomocí kalibrační přímky ze standardů o definované koncentraci. Standardem byl ovoalbumin dodávaný společně v balení.

4.8. Polyakrylamidová gelová elektroforéza

K analýze směsí bílkovin z různých biologických systémů za definovaných podmínek byla využita komplexní metoda - polyakrylamidová gelová elektroforéza. Bílkoviny byly děleny, jak v jednorozměrné variantě (**1-DE**), kdy k rozdělení proteinů dochází na základě jejich relativní molekulové hmotnosti v přítomnosti dodecylsulfátu

sodného (SDS), tak na dvourozměrných (**2-DE**) gelech, kde je navíc předřazeno dělení proteinů podle jejich izoelektrického bodu (pI).

4.8.1. Roztoky pro elektroforézu

- *Roztok akrylamidu (zásobní):* 30% akrylamid (w/v), 0,8% bis - akrylamid (w/v), přefiltrovat a uchovat ve 4 °C ve tmě.
- *Pufr I - Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8):* 27,23 g Tris báze doplnit do 80 ml destil. H₂O, upravit pH na 8,8 pomocí 1 M HCl, doplnit do 150 ml a uchovat ve 4 °C.
- *Pufr 2 - Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8):* 6 g Tris báze doplnit do 60 ml destil. H₂O, upravit pH na 6,8 1 M HCl, doplnit do 100 ml a uchovat ve 4 °C.
- *roztok SDS 10% (w/v):* k 10 g SDS přidat destilovanou H₂O do konečného objemu 100 ml, uchovat při laboratorní teplotě.
- *5x koncentrovaný elektrodový pufr, pH 8,3 (zásobní roztok):* 15,1 g Tris báze, 70,5 g glycin a 5 g SDS (w/v) doplnit do 1 l destil. vodou, uchovat ve 4 °C;
- *Vzorkový pufr I (1-DE):* 500 µl 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 500 µl 98% glycerolu, 2,5 g močoviny, 500 mg SDS, 500 mg DTT, 1 mg bromfenolové modři, a doplnit do 10 ml destilovanou H₂O, uchovat při – 20 °C.
- *Vzorkový pufr II (2-DE):* 7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS (w/v) 1% Pharmalyte pH 3-10, 1% DTT (w/v); nechat úplně rozpustit, rozplnit do mikrozkušavek a uchovat zamražené při – 70 °C.
- *Amonium persulfát (APS) 10%:* k 0,5 g APS přidat 5 ml destilované H₂O; připravit čerstvý roztok před elektroforézou.
- *Equilibrační (redukční) pufr:* 6 M močovina, 50 mM Tris báze (pH 6,8), 30% glycerol, 2% SDS, trochu bromfenolové modři, uchovat při laboratorní teplotě. Před ekvilibrací příprava dvou roztoků z tohoto pufru, jeden s přísadkou DTT (10 mg do 1 ml) a druhý s přísadkou jódacetoamidu (IAA; 25 mg do 1 ml). Mícháno vždy čerstvé.

4.8.2. Jednorozměrná elektroforéza bílkovin (1-DE)

1-D SDS-PAGE byla využívána hlavně pro jednoduchou a rychlou kontrolu kvality vzorku před vlastní a zdlohavější 2-D SDS-PAGE.

Byla používána polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) podle Laemmliho (1970). Ve vzorkovém pufru I byl solubilizován vzorek o známé koncentraci bílkovin. Solubilizace probíhala při 100 °C po dobu 5 min. Takto upravený vzorek byl nanesen v potřebném množství na gel, zbytek byl uchován v mikrozkuřavkách při –78 °C v hlubokomrazícím boxu značky Heraeus.

Pro rozlišení požadovaného spektra bílkovin byly použity gely obsahující akrylamid v koncentraci 7,5%, 10,5% a 12,5%, koncentrace zarožnávacího gelu byla ve všech případech 4%. Gel 7,5% byl použit pro lepší rozlišení a zaostření proteinů v oblasti vysokých molekulových hmotností. Schéma pro namíchání požadované koncentrace akrylamidu v gelu lze najít v jakémkoliv manuálu o elektroforéze.

Paralelně s neznámými vzorky byla na gely nanesena série komerčně dodávaných proteinových standardů molekulových hmotností (Sigma Aldrich, nebo GE Healthcare). Výběr standardu byl vždy určen typem děleného vzorku.

Vlastní elektroforéza probíhala na aparatuře MiniPROTEAN II od firmy BioRad (Hercules, CA, USA) podle přiložených instrukcí v manuálu.

4.8.3. Dvojrozměrná elektroforéza bílkovin (2-DE)

Dvojrozměrnou elektroforézou bílkovin lze získat detailnější a podrobnější informace o složení proteomu buňky či tkáně za daných fyziologických podmínek (O'Farrel 1975). Tato elektroforéza byla prováděna na zařicích Multiphor II system (GE Healthcare Life Sciences) a Investigator 2-D Electrophoresis SystemTM (Millipore).

Před vlastní analýzou byl většinou vzorek srážen pomocí trichloroctové kyseliny (TCA, finální koncentrace 6%), tím došlo k zahuštění i pročištění vzorku. Po hodinovém srážení v TCA, byl vzorek promyt etanolem (100%) a naředen na koncentraci 150 – 300 µg ve vzorkovém pufru II a uchován při –78 °C.

Před vlastní 2-D analýzou byl vzorek solubilizován při laboratorní teplotě cca 1-2 hodiny do úplného rozpuštění.

Dělení v prvním rozměru probíhalo na aparatuře Multiphor II System a byly používány IPG *stripy* (linear/non-linear Immobilized pH Gradient). Rehydratace *stripy* se vzorkem probíhala přes noc (cca 16 hodin), po které následovalo dělení v prvním rozměru na výše uvedeném zařicení. **Izoelektrická fokusace** probíhala 45000 Vh

s maximem 3500V v rozmezí 20 – 48 hodin dle typu vzorku a velikosti nanášky. *Stripy* se vzorky po fokusaci bylo možno v případě potřeby uchovat při -20 °C.

Dělení v druhém rozměru – **SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza** následovala po ekvilibraci IPG stripu v equilibračním (redukčním) pufru po dobu 10 minut s DTT a 10 min s IAA. *Strip* byl pak opatrně přenesen na povrch deskového gelu pro druhý rozměr a následovala vlastní elektroforéza na zařízeních Oxford Glycosystem Investigator – velký typ gelů (22 x 22 cm) či Hoefer typ SE600 (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA) – střední velikost gelů (18 x 16 cm). Separace pak probíhala na 10% či 12% gelech dle typu vzorku. Podrobnější informace lze také najít na <http://www.wzw.tum.de/proteomik>.

Paralelně s neznámými vzorky byla na gely nanesena série proteinových standardů molekulových hmotností, jejich rozmezí bylo vybíráno dle typu vzorku (např. Mr 97 400, 66 000, 45 000, 31 000, 21 500 a 14 500, Sigma-Aldrich).

4.9. Detekce bílkovin

4.9.1. Detekce proteinů Coomassie Brilliant Blue R250

Jednorozměrné gely byly barveny **Coomassie Brilliant Blue R250** (nespecifické barvení), což dovoluje detekci řádově 100-1000ng proteinů. Barvení probíhalo přes noc (16 hod) při laboratorní teplotě, za mírného třepání, vymytí pozadí probíhalo v odbarvovacím roztoku do odbarvení. Před sušením byly gely ponechány ve 4 °C v sušicím roztoku po dobu 30 minut, aby nedošlo k popraskání gelů. Vlastní sušení probíhalo na sušičce gelů Bio-Rad (2 hod při 72 °C).

Pro barvení gelů bylo potřeba následujících roztoků:

- *Barvicí roztok* (zásobní roztok): 0,1% Coomassie blue R250 (w/v), 40% methanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v);
- *Odbarvovací roztok*: 40% methanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v);
- *Sušicí roztok*: 25% ethanol (v/v), 3% glycerol (4%) (v/v).

Vyhodnocení získaných gelů většinou nebylo potřeba. Šlo o doplňkovou a rychlou metodu ke 2-DE, kdy se testovala kvalita vzorku. Gely byly pouze digitálně archivovány po *naskenování* na stolním *scanneru* HP Scanjet 4400C. Podrobnější analýza byla možná v programu Quantity One (BioRad).

4.9.2. Detekce proteinů koloidní Coomassie Blue

Barvení pomocí „**Colloidal Coomassie Blue**“ (CBB) bylo voleno při barvení 2-D gelů, které byly dále využity pro analýzu hmotovou spektrometrií (Neuhoff *et al.* 1985, Fontoulakis *et al.* 1999). Pokud je koncentrace vzorku v gelu dostatečná a proteiny jsou dobře obarveny, je to nejlepší řešení. Citlivost metody se pohybuje ještě níže kolem 50-500 ng. Barvení gelů probíhalo několik hodin, minimum 6 hod za mírného třepání. Odbarvování bylo snadné pouze v deionizované vodě do odbarvení pozadí.

- *Barvicí roztok* – složení: 0,08% CBB G250, 1,6% orto-fosforečná kyselina, 8% APS a 20% metanol.

4.9.3. Detekce proteinů stříbrem

Barvení 2-D gelů bylo prováděno při laboratorní teplotě podle modifikované metody dle Rabillouda (1992):

- 1) fixace gelů ve fixačním roztoku I: 40% ethanol (v/v), 10% kys. Octová (v/v), 1 hod;
- 2) fixace gelů ve fixačním roztoku II: 0,5% glutaraldehyd, 30% ethanol (v/v), 0,25% tetrathonát draselný, 6,8% acetát sodný, 1 hod (max. přes noc);
- 3) promytí gelů 4 x 15 minut v deionizované vodě;
- 4) barvení gelů 0,2% roztokem AgNO₃ (w/v) po dobu 30 minut (k roztoku přidán formaldehyd v poměru 250 µl/1 litr);
- 5) omytí deionizovanou vodou 1 minutu;
- 6) vyvolání probíhalo 5-8 minut v roztoku s 3% K₂CO₃, 0,75% Na₂S₂O₃, formaldehyd přidán v poměru 150 µl/1 litr roztoku;
- 7) zastavení barvení v zastavovacím pufru (5% Tris báze (w/v), 2% kys. octová (v/v)) 10 minut;
- 8) 3% glycerolová (v/v) lázeň minimálně 10 minut (zabrání praskání gelů při sušení).

4.9.4. Fluorescenční barvení proteinů

K detekci bílkovin krevní plazmy byla využívána **fluorescenční barva SYPRO Ruby** (Invitrogen, Molecular Probes), jejíž citlivost se pohybuje kolem 1-2 ng na *spot*, tedy srovnatelná s barvením stříbrem, ale navíc zcela kompatibilní s MS. Výhodou při barvení bylo i minimum kroků.

Postup barvení byl následující:

- *Fixace bílkovin* v gelu: fixační roztok obsahující 50% metanol a 7% kys. octovou. Fixace probíhala 2 x 30 min za mírného třepání při laboratorní teplotě a bylo použito 250 ml roztoku na gel (středně velký).
- *Barvení SYPRO Ruby*: probíhalo přes noc v barvicím roztoku v tmavých nádobách na mírného třepání. Na gel bylo použito kolem 90 - 100 ml barvy.
- *Odmyvací krok* – pro odstranění nespecifického pozadí byl použit odbarvovací roztok (10% metanol, 7% kyselina octová). Odbarvování probíhalo 30 min na třepačce. Od kroku barvení už bylo potřeba vždy gely uchovávat ve tmě (tmavé nádoby, či zakryté).
- *Oplachování gelů* – 2 x 5 min v deionizované vodě pro odstranění zbytků kys. octové.
- *Detekce* proteinových skvrn na přístroji Molecular Imager FX (BioRad). Fluorescenční barva SYPRO Ruby má dvě excitační maxima při 280 nm a 450 nm, emisní maximum se pohybuje kolem 610 nm.

4.9.5. Detekce bílkovin pomocí inkorporace radioaktivního izotopu [³⁵S]-metioninu

Pulzové značení mikroorganismů je metoda, která se zejména používá při studiu biosyntézy makromolekul. S její pomocí lze odlišit rychle se tvořící nebo rychle obměňované malé frakce makromolekulárních buněčných sloučenin od stabilních makromolekul, které jsou přítomné v buňkách v podstatně větším množství.

Inkorporace značeného prekurzoru se nejrychleji zastaví nízkou teplotou, kdy se suspence rostoucích bakterií umístí na led. Navíc lze použít k zastavení růstu i přídavek vhodného antibiotika. U pokusů s *B. subtilis* byl přidáván STOP pufr, obsahující chloramfenikol, který blokuje proteosyntézu u rostoucí bakterie.

Radioaktivní izotop [³⁵S]:

[³⁵S] izotop je zářič s relativně nízkou energií (0,167 MeV).

Poločas rozpadu izotopu [³⁵S] je 87,4 dnů.

Při přípravě roztoků bylo použito vztahu:

$$1\text{mCi} = 37\text{ MBq}; (1\text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10}\text{ rozpadů / sec.}).$$

4.9.5.1. Radioaktivní značení bílkovin – *B.subtilis*

Pro získání údajů o indukci stresových membránových proteinů při pH stresu bylo použito krátkého pulzu radioaktivně značeného prekursoru [³⁵S]-metioninu (M.G.P. spol. s r.o. Zlín) metodou popsanou v práci Graumanna *et al.* (1996).

Použité roztoky:

- STOP roztok: 0,1 M Tris-HCl (pH 7.5) (w/v)
0,01 M metionin (w/v)
1 mg chloramfenikol/ml;
- 1) k exponenciálně rostoucím bakteriím přidán [³⁵S]-metionin (4μCi/ml);
- 2) značení ukončeno po 10 minutách;
- 3) růst buněk ukončen přidáním 1/10 objemu ledového STOP roztoku (dát na led);
- 4) filtrace buněk s použitím vodní vývěvy (filtry Pragopor č.5, průměr 24mm, velikost pórů 0,6 μm);
- 5) získaný sediment byl resuspendován v 5 ml 50 mM KH₂PO₄ - K₂HPO₄ pufru (pH 8,0);
- 6) získané vzorky byly použity k izolaci membránové frakce podle Bisschopa a Koningse (**Kap.4.6.1.**), byla stanovena koncentrace bílkovin (**Kap.4.7.1.**) a vzorky byly připraveny k analýze pomocí 2-DE (**Kap.4.8.3.**).

Takto označené membránové proteiny byly analyzovány metodou 2-DE na aparatuře Multiphor II a Hoefer. Výsledné 12,5 % gely byly vloženy do kazety na záchyt β částic z rozpadající se radioaktivní síry a po 4-5 dnech vyhodnoceny na zařízení Molecular Imager FX (BioRad). Zachycené radiogramy z gelů byly následně vyhodnoceny pomocí programu PDQuest 7.3.1.

4.9.5.2. Radioaktivní značení bílkovin – *E. coli*

Z důvodu přesné kvantifikace bílkovin na gelu byla použita metoda inkorporace radioaktivního izotopu. Kontinuální kultivace *E. coli* poskytla vzorky bakterií z jednotlivých odběrových časů (43 hod, 68 hod a 103 hod), které byly uchovány v glycerolu. Tyto bakteriální kultury byly naočkovány do media M9 a kultivovány při 37 ° C do nárůstu O.D._{600nm} 0,4-05 (tedy cca 4-5 dělení). Po té následoval přidavek [³⁵S]-

metioninu (10 μ Ci/ml) a kultura nadále rostla 1 hodinu při stejných kultivačních podmínkách.

Kultivace byla ukončena přidavkem TCA (finální koncentrace 12,5%) a bylo dále postupováno stejně jako při izolaci bílkovin z *E. coli* (**Kap.4.6.2.**)

4.9.6. Vyhodnocení gelů

Vyhodnocování gelů probíhalo pomocí software PDQuest 7.3.1., který je zaměřen na kvantifikaci a standardizaci 2-D gelů. Většina hodnocení byla dělána pomocí tohoto programu. 1-D gely nebyly většinou počítačově hodnoceny, ale lze využít obdobný program od firmy BioRad „Quantity One“.

Pro orientační zjištění relativních molekulových hmotností neznámých spotů (proteinů) na gelu lze využít i metodu vycházející z retenční koeficientu R_f (Bollag *et al.* 1996).

$$R_f = \frac{\text{migrační vzdálenost proteinu}}{\text{vzdálenost od začátku k čelu gelu}}$$

Lze vypočítat hodnoty R_f standardů a jim příslušející \log_{10} ze známých relativních molekulových hmotností. \log_{10} standardů je pak vyneseno do grafu v závislosti na jejich R_f . Relativní molekulovou hmotnost neznámého proteinu lze odečíst z grafu na základě jeho R_f .

4.9.7. Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určování hmotností atomů a jejich částí po jejich převedení na ionty (ionizaci). Nejvíce se využívá ionizace nárazem elektronů.

K dělení iontů dochází v kvadrupolovém analyzátoru, a to podle poměru m / z , kde

m ...hmotnost vzniklého iontu

z počet elementárních nábojů, které iont nese.

Většina iontů nese jeden elementární náboj, takže lze obecně říci, že se dělí dle hmotnosti. Součástí přístroje je zesilovač signálu, který umožňuje počítačové vyhodnocení.

Postup identifikace vybraných bílkovinných *spotů* byl následující:

Proteiny k identifikaci byly vyříznuty z gelu obarveného CBB nebo stříbrem a rozřezány na malé kousky. Po odbarvení (0.1 M 4-ethylmorpholin acetátem v 50% acetonitrilu pro CBB gel nebo roztokem obsahujícím 50% 0.1M thiosíranu sodného a 50% 0,1M hexakynoželezitanu draselného pro gel barvený stříbrem) byl gel několikrát promýván střídavě acetonitrilem a vodou, a poté částečně vysušen na vakuové odparce. Proteiny byly štěpeny přímo v gelu přes noc v pufru obsahujícím trypsin (10 ng), 0,01% 2-mercaptoethanol, 50 mM 4-ethylmorpholin acetát při pH 8,1. Vzniklé peptidy byly extrahovány 30% acetonitrilem v 0,1% TFA. Hmotnostní spektra pozitivních iontů byla měřena na hmotnostním spektrometru s desorpcí a ionizací laserem za přítomnosti matrice Ultraflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometer). Jako MALDI matrice byla použita α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (10 mg/ml v 50% acetonitrilu/0,1% TFA). Spektra byla měřena v hmotnostním rozsahu m/z 0-5000 Da a spektrometr byl kalibrován pomocí směsi peptidových standardů PepMix (Bruker Daltonics). Identifikace proteinů byla provedena metodou peptidového mapování na základě prohledání seznamu peptidových hmot pomocí programu MASCOT proti proteinové databázi SwissProt (*B. subtilis* nebo *E. coli*).

4.10. Fluorescenční spektroskopie

4.10.1. Anizotropie fluorescence sondy DPH

Pro stanovení změn v mikroviskozitě membrán, které byly izolovány z buněk kultivovaných v komplexním mediu o extrémním pH 5,0 a 8,5, byla použita metoda Shinitzkého a Barenholze (1974 a 1978), kteří odvodili vztah mezi mikroviskozitou a polarizací fluorescence sondy. Pro fluorescenční měření byla použita hydrofobní fluorescenční sonda 1,6-difenyl-1,3,5 hexatrien (DPH), která se při styku s membránou

lokalizuje v oblasti řetězců mastných kyselin fosfolipidů. Metoda popsána v práci Lakowicze (1983) a Konopáska (1992).

4.10.2. Pulzní časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Pro detailní zmapování změn ve struktuře a dynamice cytoplazmatických membrán bakterie *B. subtilis*, byly vzorky měřeny fluorescenční metodou „pulzní časově rozlišenou fluorescenční spektroskopií“. Pulzní metoda dovoluje určit detailnější parametry membrány jako je např. doba života excitovaného stavu. Vzorek s fluorescenční sondou je excitovaný krátkým světelným pulsem na rozdíl od měřené r_{ss} (*steady state anisotropy*), která je měřena při kontinuálním osvětlení. Měření anizotropie fluorescence v časovém rozlišení umožňuje také určit rotační rychlost sondy.

Prvním pokusem ozřejmit nenulovou limitní anizotropii při měření dohasínání anizotropie DPH v membránách bylo vytvoření tzv. „kuželového modelu“ Kinositou *et al.* (1977). Sonda kmitá uvnitř kužele, jehož osa je kolmá k rovině membrány a velikost vrcholového úhlu Θ_c tohoto kužele je ovlivňována rozsahem pohybů okolních molekul fosfolipidů. Interpretace pohybu sondy pomocí kuželového modelu má však svá úskalí. Předpokládá, že sonda rotuje určitou rychlostí až ke hranici kužele, kterou nemůže fyzicky překonat. Tento předpoklad se ukázal jako nerealistický (Lentz 1989). Proto byl navržen tzv. gaussovský model, který navrhuje gaussovskou distribuci sondy uvnitř kužele.

Uvažujeme-li DPH v membráně, pak orientace této molekuly může být popsána orientační distribuční funkcí $f(\beta)$, kde β je úhel, který svírá excitační dipól sondy s osou kolmou k povrchu membrány. Distribuční funkce se vyjadřuje jako nekonečná řada goniometrických funkcí úhlu β . Parametry uspořádání $\langle P_L \rangle$ vystupují jako koeficienty Legendrova polynomu:

$$f(\beta) = \frac{1}{2} \sum_{L=1}^n (2L+1) \langle P_L \rangle P_L(\cos \beta)$$

Platí přitom, že $\langle P_2 \rangle = \langle 3\cos^2 \beta - 1 \rangle$ a $\langle P_4 \rangle = \langle 35\cos^4 \beta - 30\cos^2 \beta + 3 \rangle$.

Distribuční funkce je úplně určena tehdy, jsou-li známy všechny parametry uspořádání (vyčísľují se $\langle P_n \rangle$ pouze pro sudá n). Experimentálně je však možno určit

jen parametry $\langle P_2 \rangle$ a $\langle P_4 \rangle$. Zatímco určení $\langle P_2 \rangle$ patří k základním technikám membránové spektroskopie, určování parametru $\langle P_4 \rangle$ je složitější. Zatímco samotná hodnota $\langle P_2 \rangle$ nestačí pro konstrukci distribuční funkce, pomocí $\langle P_2 \rangle$ a $\langle P_4 \rangle$, je možno spolehlivě distribuční funkci zkonstruovat.

4.10.2.1. Měření anizotropie fluorescence v časovém rozlišení

Získaná membránová frakce byla značena DPH při laboratorní teplotě. Inkubace s DPH trvala 30 minut (finální koncentrace sondy DPH $2 \cdot 10^{-6}$ M) při 40 °C.

Měření bylo prováděno na aparatuře postavené ve Fyzikálním ústavu MFF UK v Praze, která pracuje metodou korelovaného čítání fotonů. Tento modulární přístroj je detailně popsán v práci Šípa *et al.* (1988).

Excitačním zdrojem je barvivový laser s akusto-optickým modulátorem rezonátoru čerpaný synchronně Ar^+ laserem se synchronizovanými módy. Excitační vlnová délka byla 356 nm. Emisní monochromátor s konkávní holografickou mřížkou byl nastaven na vlnovou délku 425 nm. Byly měřeny tři křivky dohasínání – celková intenzita fluorescence snímaná emisním polarizátorem pod magnetickým úhlem, dále rovnoběžná a kolmá složka emise. V průběhu měření byl vzorek probubláván dusíkem. Přístrojové funkce byly kalibrovány při Ramanově rozptylu v roztoku KI ve vodě (417nm).

Při zpracování výsledků byla použita metoda globální analýzy (Beechem *et al.* 1985), jako vstupní údaje byly použity všechny křivky dohasínání. Dohasínání intenzity DPH bylo modelováno jako suma dvou exponent. Dohasínání anizotropie fluorescence bylo analyzováno na základě obecného modelu (Van der Meer *et al.* 1984), který dovoluje vypočítat parametr uspořádanosti $\langle P_2 \rangle$.

Konkrétní implementací výpočetních metod byl program GLOBAL vyvinutý Heřmanem (1988) v programovém prostředí ASSYST. Analýza byla prováděna po skončení měření.

5. VÝSLEDKY

5.1. Studium bakteriální membrány *Bacillus subtilis* 168_{trp2} dlouhodobě vystaveného pH stresu

Prvním z mých proteomových projektů byla analýza membránových proteinů bakterie *Bacillus subtilis*. Tato půdní nepatogenní bakterie slouží jako modelový organismus v řadě vědeckých studiích včetně proteomových. Studium membránové frakce této bakterie, vzhledem k mým předchozím experimentům, bylo tak nevyhnutelným krokem k pochopení funkce proteinové a lipidové složky membrány.

5.1.1. Růstová charakteristika *B. subtilis* v závislosti na pH kultivace

Základem mých experimentů byla vždy standardní a reprodukovatelná kultivace *B. subtilis* dlouhodobě exponovaného suboptimálnímu pH, která poskytla bakterie v ustáleném stavu, tedy plně adaptované na dané prostředí. Celková doba kultivace v daném pH trvala cca 20 hodin a zahrnovala růst bakterií přes noc na šikmém agaru v pH 5,0, nebo pH 8,5 a následnou kultivaci v tekutém mediu o stejném pH. Současně byl sledován růst bakterií v kontrolních podmínkách (pH 7,0), (**Kap.4.5.1.1.**).

Dlouhodobý růst *B. subtilis* v extrémním pH vede k úplné adaptaci, kdy bakterie dosáhne ustáleného stavu. Adaptace po dlouhodobé expozici suboptimálnímu pH tak poskytne ucelený pohled na strategii přežití; proto byla optimalizací této metody věnována velká pozornost a čas.

Při pokusech byl sledován i vliv iontové síly fosfátového pufru, který je standardně do komplexního média přidáván, a nakonec byla vybrána taková koncentrace puфраční složky, aby růstová rychlost bakterie a tedy její fyziologie, nebyly ovlivněny její molaritou, ale pouze vlivem kyselého, resp. bazického pH (Petráčková 2003). K následným pokusům byl použit 0,025 M fosfátový pufar, který daná kritéria splňuje.

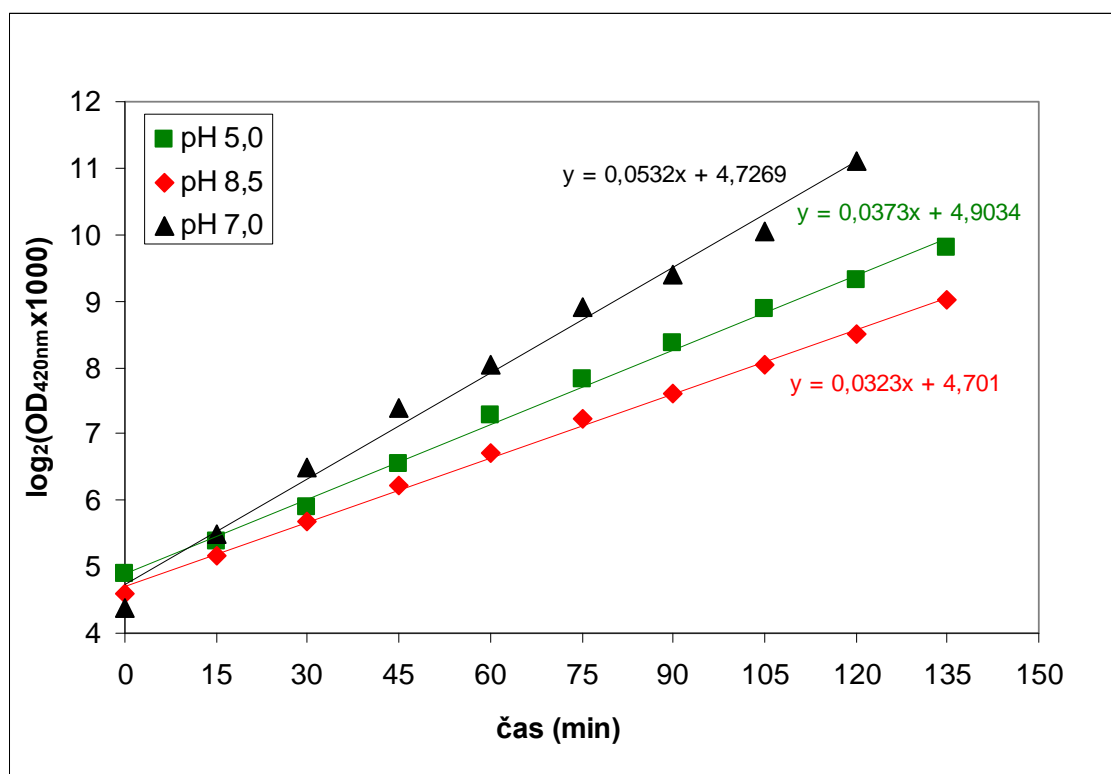
Navíc bylo zjištěno, že pH media se během růstu bakterie mění a jeho hladina byla v čase udržována přidavky 0,5 M KOH, resp. HCl.

Doba zdvojení *B. subtilis* při růstu v pH 5,0 v mediu s 0,025 M fosfátovým pufrem byla 27 minut (**Obr.9**), doba lagu bakterie se pohybovala kolem 120 minut. K izolaci membrán byly v tomto případě použity bakterie již z ranního inokula, protože po dalším přeočkování docházelo k nežádoucímu shlukování bakterií. Kultivace v pH 5,0 byla stabilní a, na rozdíl od kultivace v pH 8,5, nebylo třeba pH media během pokusu upravovat.

Doba zdvojení bakterií v mediu o pH 8,5 se pohybovala kolem 31 minut (**Obr.9**). Doba lagu byla okolo 100 minut. pH při kultivaci bylo po celou dobu růstu udržováno konstantní definovanými přísadkami 0,5 M KOH.

Doba zdvojení u kontrolní kultivace byla 19 min (**Obr.9**), doba lagu se pohybovala okolo 80 minut.

OBR. 9.: Růst *B. subtilis* v komplexním mediu o pH 5,0 , pH 8,5 a pH 7,0



Dlouhodobá adaptace *B. subtilis* na extrémní pH v komplexním mediu s 0,025M fosfátovým pufrem. V grafu jsou uvedeny i rovnice regrese jednotlivých růstových křivek. Kultivace v pH 5,0 označena zeleně (T = 27 min), kultivace v pH 8,5 červeně (T = 31 min) a kontrola černě (pH 7,0; T = 19 min). Vybrán byl reprezentativní pokus ze 3 paralelních stanovení.

Vzhledem k tomu, že se doba zdvojení exponenciálně rostoucích bakterií v tekutém mediu po dobu kultivace neměnila, lze předpokládat, že se bakterie na dané pH plně adaptovala.

Vzhledem k předešlým výsledkům získaným v rámci diplomové a rigorózní práce (Petráčková 2001 a 2003) bylo úsilí soustředěno právě na dlouhodobě adaptované bakterie, které dosáhly ustáleného fyziologického stavu. Membránové frakce získané z exponenciálně rostoucích bakterií dlouhodobě kultivovaných v kyselém pH posloužily k proteinovým analýzám membránových a s membránou asociovaných membránových bílkovin. Tyto proteinové studie byly nezávisle doplněny i fyzikálně-chemickou analýzou, kdy pomocí fluorescenční metody (pulzní časově rozlišené anizotropie fluorescence sondy DPH) byla sledována rigidita membrány pro obě kultivační pH.

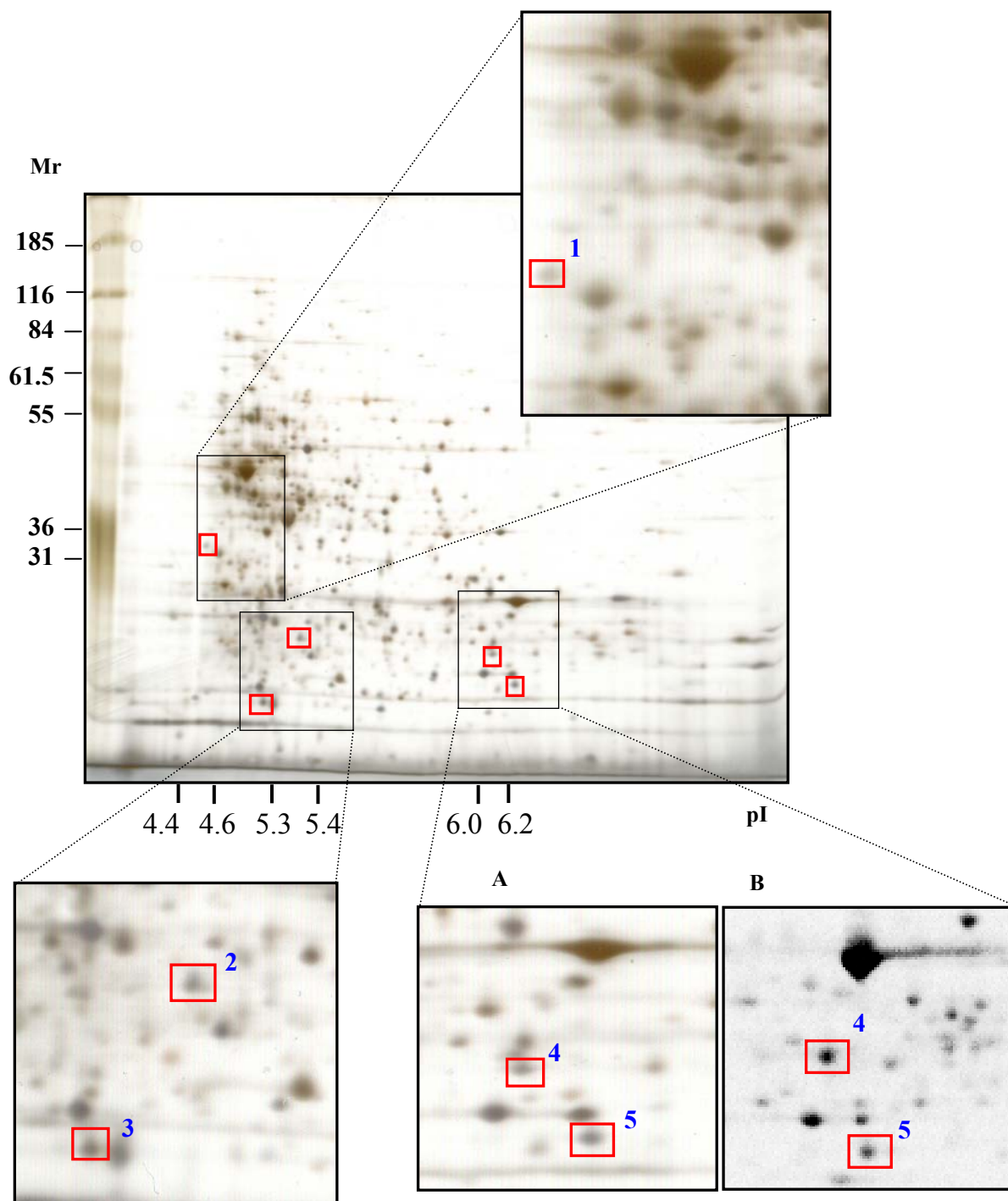
5.1.2. Analýza proteinů cytoplazmatické membrány *B. subtilis* pomocí 2-D elektroforézy

V diplomové práci byly pomocí 1-D elektroforézy detegovány kvantitativní změny ve spektru membránových bílkovin izolovaných z bakterií dlouhodobě adaptovaných na pH 5,0. V následné rigorózní práci byly analýzy uskutečněny ve spolupráci s MBÚ. Slibné výsledky vedly v pokračování projektu a k zavedení 2-DE i na našem fakultním pracovišti a ke zdokonalení technik pro přípravu membránových vzorků pro 2-DE experimenty.

K analýze byly použity membránové izoláty buněk *B. subtilis* dlouhodobě adaptovaných na pH 5,0. Pro standardizaci experimentu bylo zvoleno i radioaktivní *in vivo* značení bílkovin pomocí izotopu [³⁵S]-metioninu. Membránové frakce byly izolovány metodou podle Bisschopa a Koningse (1976), dělení bylo provedeno na 10 % polyakrylamidových SDS gelech o rozměrech 18 x 16 cm (střední velikost gelů) (**Kap.4.8.3.**).

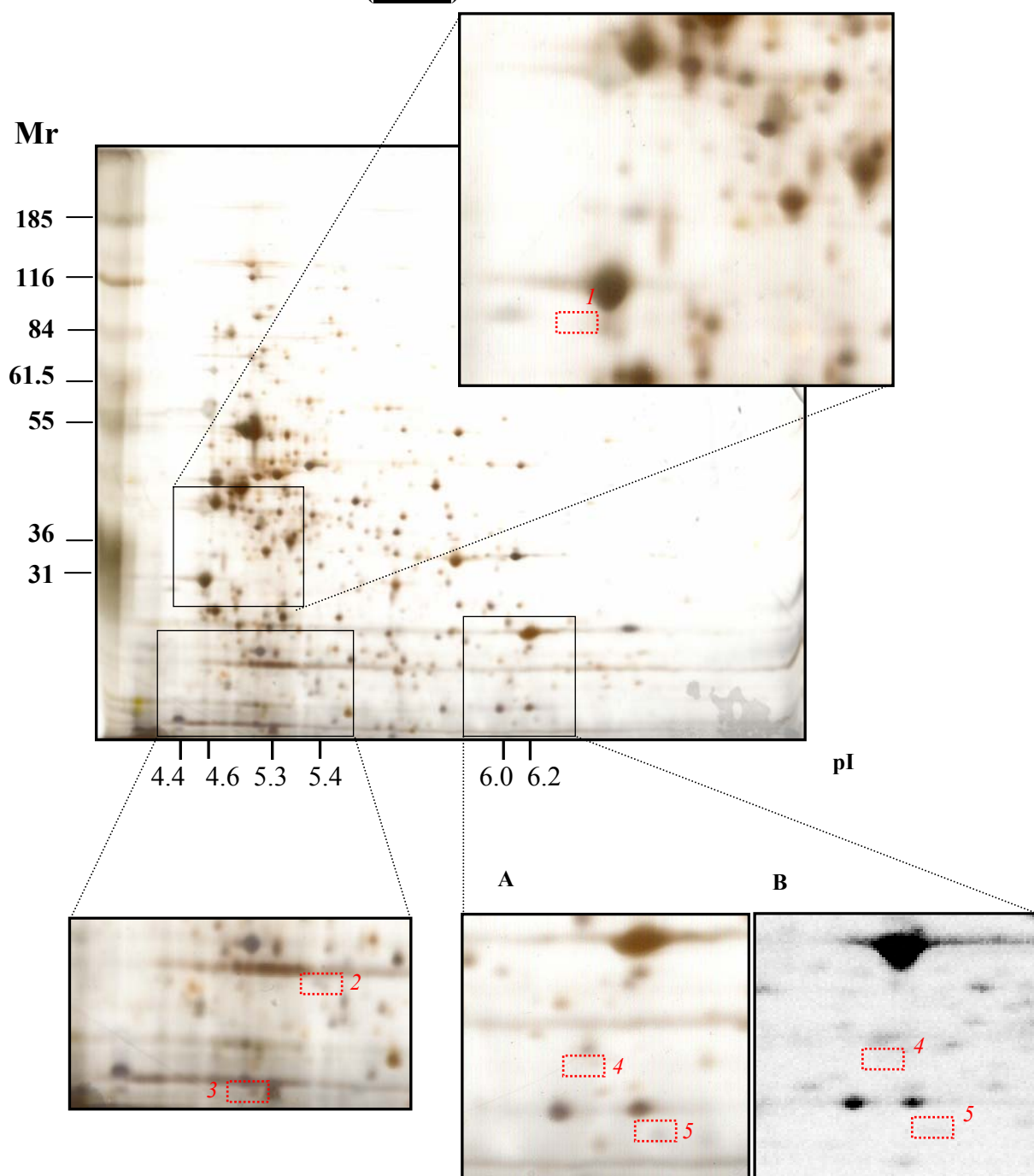
Vyhodnocení a srovnání gelů (**Obr.10 a 11**) bylo prováděno pomocí počítačového programu PDQuest 7.3.1. Gely byly *naskenovány* a jejich nasnímané obrazy (*images*) byly vyhodnocovány.

OBR. 10.: Dvojrozměrná elektroforéza membránových bílkovin *B. subtilis* dlouhodobá adaptace na pH 5,0



Reprezentativní proteom membránové frakce bakterie *B. subtilis* – dlouhodobá adaptace na pH 5,0 (20 hod). Na gel bylo naneseno 300 µg proteinů (A), resp. 5×10^5 dpm (B). Pro separaci byly použity IPG *stripy* pH s gradientem v rozmezí pH 3-10 a 10% SDS-PAGE gely, proteiny byly detegovány stříbrem (A) a *in vivo* značeny izotopem [^{35}S]-metioninu (B). Výřezy detailněji ukazují oblasti, kde došlo k proteinovým změnám po stresu, označené proteinové skvrny byly následně identifikovány MALDI-TOF a jsou uvedeny v **Tab.2**. Rozsah Mr (v tis.) a pI je označen v obrázku.

OBR. 11.: Dvojrozměrná elektroforéza membránových bílkovin *B. subtilis* kontrolní kultivace (pH 7,0)



Reprezentativní proteom membránové frakce bakterie *B. subtilis* – **Kontrola** (pH 7,0). Na gel bylo naneseno 300 µg proteinů (A), resp. 5×10^5 dpm (B). Parametry pokusu stejné jako jsou uvedeny pod **Obr.10**.

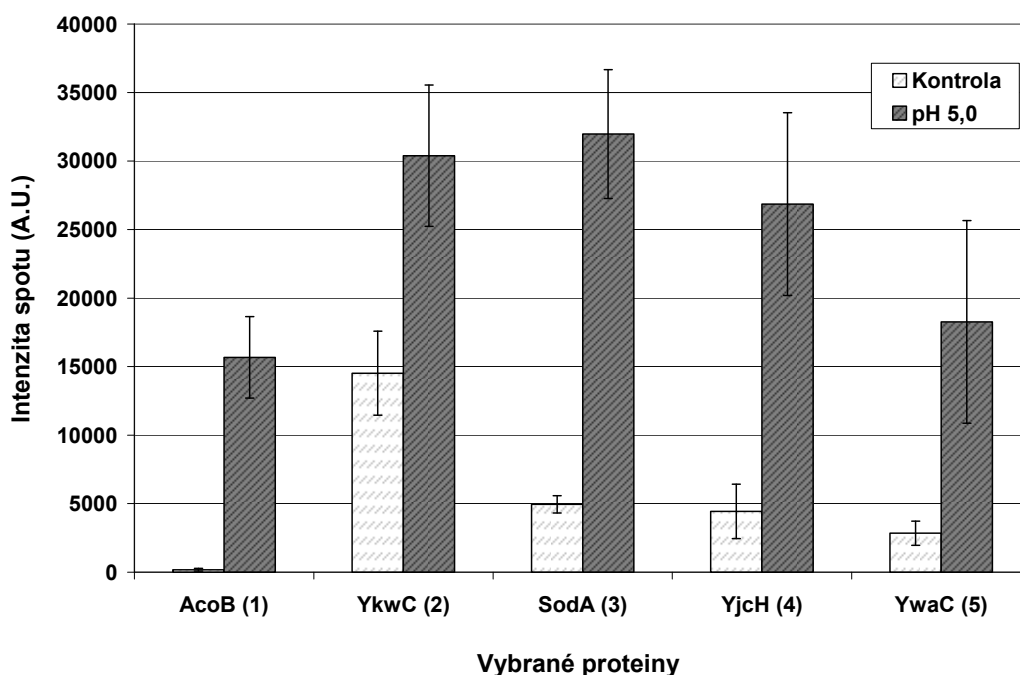
Srovnání proteinového profilu vzorků z pH 5,0 a kontroly (**Obr.10 a 11**) ukázalo, že vliv dlouhodobé adaptace na extrémní pH vede ke kvalitativním i kvantitativním změnám ve spektru membránových bílkovin *B. subtilis*.

Celkově byly zjištěny změny u nejméně 25 proteinů membránové frakce, jejichž intenzita se po stresu mění. U některých se jednalo o zvýšenou, u jiných o sníženou syntézu (data nejsou prezentována). K významné změně v porovnání s kontrolní kultivací došlo u 5 stresových proteinů.

U vzorku z pH 5,0 v porovnání s kontrolní kultivací byly pozorovány tyto podstatné změny v proteinové expresi: syntéza proteinu č.1 byla 9krát zvýšena, proteinu č.3-5 zvýšena 6krát a proteinu č.2 pouze 2krát (**Obr.12**).

Tyto proteiny byly následně identifikovány MALDI-TOF jako AcoB, YkwC, SodA, YjcH a YwaC (**Tab.2 a 3**).

OBR. 12.: Intenzity vybraných proteinů - dlouhodobá adaptace *B.subtilis* na pH 5,0



Graf znázorňuje kvantitativní zastoupení vybraných bílkovin při dlouhodobé kultivaci *B. subtilis* v pH 5,0 (tmavé sloupce) v porovnání s kontrolní kultivací (světlé sloupce). Kvantita (intenzita) je uvedena v bezrozměrných jednotkách (A.U., Arbitrary Units) jako velikost plochy, kterou zaujímá *spot* na gelu (integrováno a normalizováno programem PDQuest). Proteiny jsou pojmenovány dle identifikace pomocí MALDI-TOF. Uvedená čísla spotů odpovídají číslům proteinů na gelu (**Tab.2**).

TAB.2.: Identifikace stresových proteinů *B. subtilis* pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Č.	Proteiny kyselého stresu		Počet peptidů	Pokrytí (%)	MASCOT	Mr	pI
1	AcoB	Acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase (beta subunit)	10	34	128	37	4,6
2	YkwC	Uncharacterized oxidoreductase YkwC	11	36	94	31	5,3
3	SodA	Superoxide dismutase [Mn]	6	33	91	22	5,3
4	YjcH	Uncharacterized protein YjcH	(8)	(40)	(136)	28	6,0
5	YwaC	GTP diphosphokinase YwaC	9	34	124	25	6,2

Tabulka uvádí čísla proteinových skvrn (*spotů*) na gelu, jména identifikovaných proteinů s uvedením označení v databázi SwissProt, počet peptidů shodných s identifikovaným proteinem, % pokrytí sekvence proteinu („coverage“) a teoretické hladiny Mr (v tis.) a pI. Protein YjcH identifikován z paralelního gelu.

TAB.3.: Identifikované stresové proteiny *B. subtilis*

	Stres. protein	DBT N°	Popis	Zdrojová data
1	AcoB	O34591	2,6-dichlorophenolindophenol-dependentní štěpení acetoinu na acétát a acetaldehyd.	Grundy <i>et al.</i> 1993, Ali <i>et al.</i> 2001
2	YkwC	O34948	Patří do rodiny 3-hydroxyizobutyát dehydrogenáz; zřejmě obsahuje transmembránové domény.	http://www.uniprot.org/uniprot/O34948
3	SodA	P54375	Odbourává radikály: $2 \text{ superoxid} + 2 \text{ H}^{(+)} = \text{O}_{(2)} + \text{H}_{(2)}\text{O}_{(2)}$; indukován stresovými podmínkami.	Inaoka <i>et al.</i> 1999, Periago <i>et al.</i> 2002, Inaoka <i>et al.</i> 1998, Hirose <i>et al.</i> 2000
4	YjcH	O31630	Hydroláza (zřejmě); obsahuje jednu teoretickou transmembranovou doménu.	http://www.uniprot.org/uniprot/O31630
5	YwaC	P39583	(p)ppGpp syntetáza; YwaC má pravděpodobně menší úlohu při odpovědi na nedostatek živin, je pod kontrolou sigma W regulonu.	Nanamiay <i>et al.</i> 2008, Cao <i>et al.</i> 2002,

Tabulka uvádí podrobnější popis proteinů s uvedením jejich funkce a zdrojových dat, navíc je uvedeno označení proteinu v databázi SwissProt. Tabulka navazuje na **Tab.2.**

Tento experiment ukázal, že dlouhodobá adaptace bakterií na suboptimální pH vede ke změnám v bílkovinném složení membrány *B. subtilis*. V kyselém pH bylo zaznamenáno celkově 25 proteinových změn, z toho 5 významných. Dva z těchto

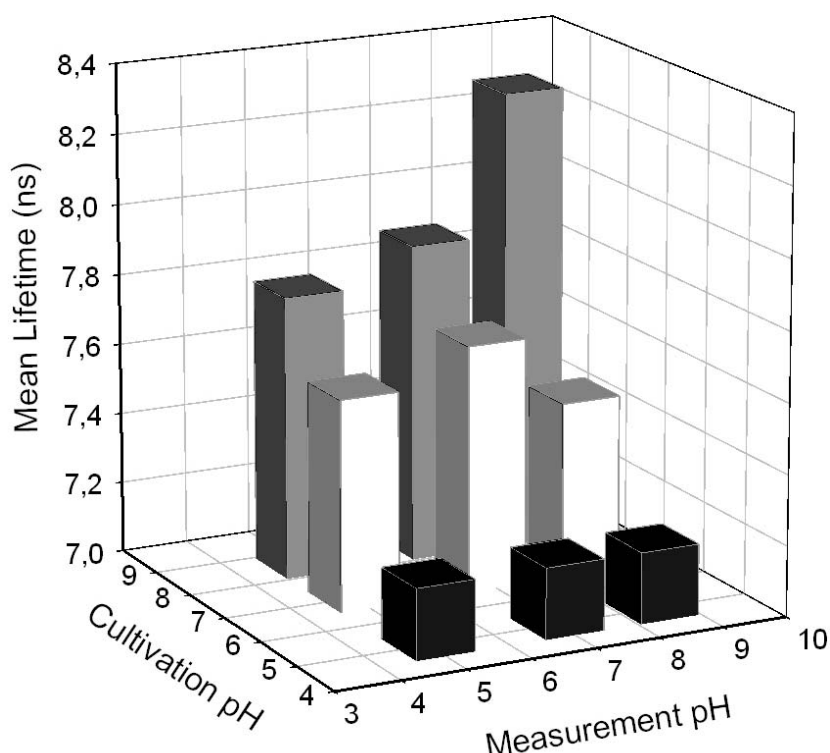
proteinů (YjcH a YwaC) se objevily i u zcela odlišné stresové situace (etanolový stres) a lze předpokládat, že se jedná o obecné stresové bílkoviny (Petráčková, Šemberová *et al.* 2010).

Tyto výsledky byly doplněny nezávislou analýzou membrány *B. subtilis* pomocí metody časově rozlišené anizotropie fluorescence sondy DPH. Inkorporace fluorescenční sondy do membrány bakterie ukazuje na fyzikální stav membrány, na kterém se podílí jak fosfolipidová matrix tak bílkoviny.

5.1.3. Pulzní časově rozlišená fluorescenční spektroskopie sondy DPH

V druhé části projektu byla charakterizována fyzikální složka membránových frakcí *B. subtilis* kultivovaného dlouhodobě v suboptimálním pH 5,0 a 8,5. Efekt kyselého, resp. alkalického pH doložily i analýzy lipidů (Petráčková 2003, Petráčková, Večeř *et al.* 2010). Navíc metoda fluorescenční spektroskopie umožnila podrobnější analýzu membránové struktury i dynamiky a nabídla další fyzikální interpretaci adaptace bakterie na extrémní pH prostředí. Byly připraveny membránové izoláty z pH 5,0, pH 7,0 a pH 8,5. Každý izolát byl následně resuspendován ve 0,025 M fosfátovém pufru o pH 5,0, pH 7,0 a pH 8,5. Takto připravené vzorky byly označeny fluorescenční sondou DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien), (**Kap.4.10.2.**). Značené membránové vzorky byly při laboratorní teplotě přeneseny a měřeny na aparatuře postavené ve Fyzikálním ústavu MFF UK v Praze, která pracuje metodou korelovaného čítání fotonů. Tento modulární přístroj je detailně popsán v práci ŠÍPA *et al.* (1988).

V první fázi měření byly zjišťovány doby života excitovaného stavu sondy DPH (τ) u cytoplazmatických membrán bakterií kultivovaných v pH 5,0, pH 7,0 a pH 8,5. V průběhu měření byly zaznamenány celkově 4 komponenty (τ_1 – τ_4), z nichž byla vypočítaná střední doba života excitovaného stavu (τ_{mean}) v jednotlivých typech membrán. Detailní závislost střední doby života excitovaného stavu na kultivačním a měřeném pH je zobrazena na **Obr.13**.

OBR. 13.: Střední doba života excitovaného stavu sondy DPH (τ_{mean})

Graf ukazuje závislost střední doby života excitovaného stavu sondy DPH (ns) ve vzorcích z kultivačního pH 5,0 (černé sloupce), pH 7,0 (bílé sloupce) a pH 8,5 (šedé sloupce) v závislosti na pH roztoku, kde byly vzorky měřeny. Standardní odchylka činila 0,05 ns.

Z výsledku je patrné (**Obr.13**), že, bez ohledu na pH měření, se zvyšujícím pH kultivace dochází ke zvyšování střední doby života excitovaného stavu (τ_{mean}). Tyto změny tak korelují s pozorováním změn v zastoupení fosfolipidů v membráně bakterie vlivem kultivačního pH, kdy membrána z pH 5,0 je nejvíce kompaktní. Naproti tomu je zřejmé, že vliv pH měření na hodnotu τ_{mean} je zanedbatelný zvláště u vzorků z pH 5,0 a pH 7,0.

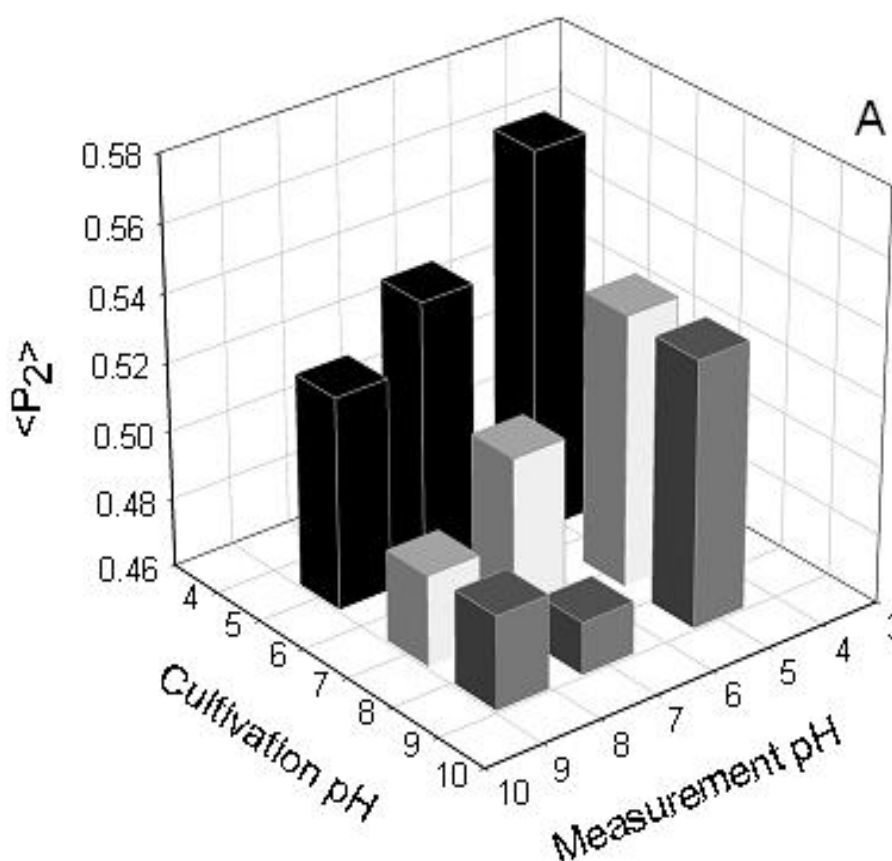
Dalším přístupem pro ověření vlivu pH na dynamiku membrány bakterie exponovanou extrémnímu pH bylo měření časově rozlišené fluorescenční anizotropie sondy DPH zaměřené na stanovení parametru uspořádanosti $\langle P2 \rangle$, který charakterizuje uspořádanost membrány. Výsledek je demonstrován na **Obr.14**. Podrobnosti k výpočtu lze najít v článku Petráčková, Večeř *et al.* 2010, nebo v odpovídající literatuře (van der Meer *et al.* 1984, Kinosita *et al.* 1977). Mezními hodnotami pro parametr $\langle P2 \rangle$ je 1,

kdy je membrána zcela uspořádána a pohyb sondy DPH je značně omezen, pro hodnotu parametru $\langle P_2 \rangle = 0$ je naopak membrána neuspořádána a pohyb sondy je volný.

Z Obr.14 je patrné, že membrána z pH kultivace 5,0 je neuspořádanější a se zvyšujícím se pH kultivace uspořádanost klesá. Podobný závěr lze učinit i pro pH měření zvláště při porovnání vzorků z pH 7,0 a pH 5,0.

Uspořádanost membrány se tak jeví jako významná pro modulaci propustnosti pro protony a schopnosti buňky udržovat stále intracelulární pH bez ohledu na rozsáhlou variabilitu vnějších podmínek.

OBR. 14.: Pulzní časově rozlišená anizotropie fluorescence – parametr uspořádanosti $\langle P_2 \rangle$ membrány *B. subtilis* z jednotlivých pH kultivace a měření



Graf ukazuje závislost parametru uspořádanosti $\langle P_2 \rangle$ sondy DPH v membráně bakterie z pH 5,0 (černé sloupce), pH 7,0 (bílé sloupce) a pH 8,5 (šedé sloupce) na pH měřicího roztoku.

Ukazuje se, že změny prostředí vyvolávají odpovídající modulaci mikroprostředí membrány bakterie, kam se sonda DPH inkorporuje, a jsou tak výsledkem membránové adaptace bakterie *B. subtilis*.

5.2. Srovnávací proteomová studie adaptace populace *Escherichia coli* rezistentní k erytromycinu při kontinuální kultivaci

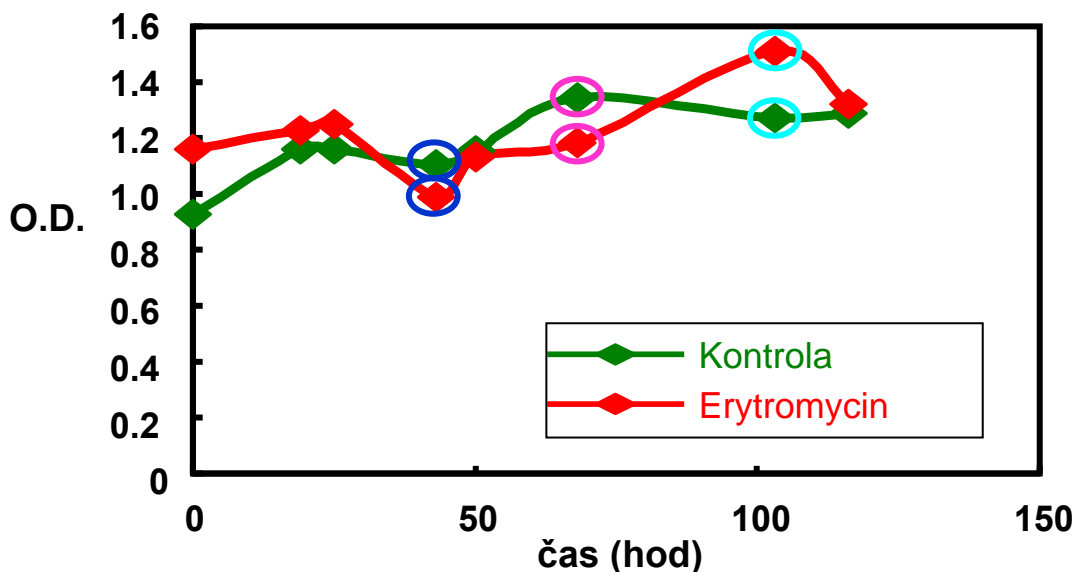
Dalším proteomovým projektem byla srovnávací analýza bílkovinných profilů enterobakterie *Escherichia coli*. Náš projekt byl zaměřen na vývoj proteomu celé populace bakterií rostoucí po několik desítek generací v nelimitovaném chemostatu a na vývoj antibiotické rezistence a dalších fyziologických parametrů. Pomocí kontinuální kultivace, která nám dovolila přiblížit se reálným podmínkám, byly bakterie kultivovány v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika erytromycinu a byly pozorovány změny v proteinovém spektru bakterie v experimentu s antibiotikem a v kontrolním experimentu.

5.2.1. Fyziologická charakteristika bakterie *E. coli* kontinuálně kultivované v nelimitovaném chemostatu

První část experimentů vedla k přípravě adaptované kultury *E. coli* na definované kultivační podmínky. Pro věrnou stimulaci přírodních podmínek byla vybrána kontinuální kultivace bakterie *E. coli* v zařízení chemostat (nelimitovaný) v minimálním médiu M9. Kultivace probíhala ve dvou paralelně zapojených systémech, kde v jednom bylo přítomno antibiotikum erytromycin v koncentraci 50 µg/ml a druhé bylo kontrolní, bez přídavku antibiotika. V průběhu kultivace byly sledovány základní fyziologické parametry buňky jako zákal (O.D., **Obr.15**), či generační doba, ale také hladina exprese EF-Tu nebo relativní přesnost translace (**Obr.16**).

Kultivační profil bakterie přehledně znázorňuje graf na **Obr.15**, kde zelená křivka znázorňuje průběh kontrolního růstu a červená křivka kulturu s přídavkem erytromycinu. Celková doba kultivace byla 120 hod, což odpovídá průměrně 100-120 generacím (**Kap.4.5.1.2.**).

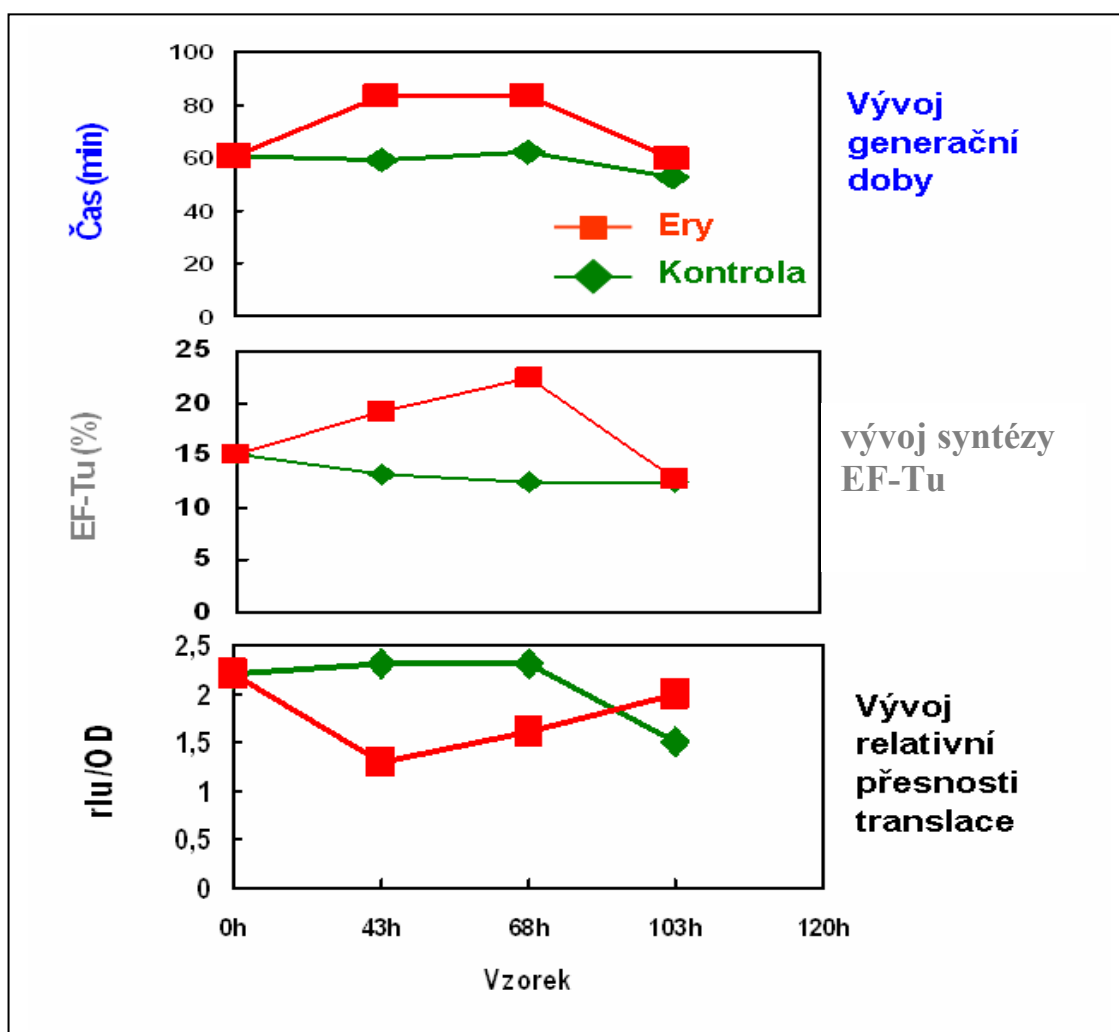
OBR. 15.: Růst *E.coli* v průběhu kontinuální kultivace v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika erytromycinu



Graf znázorňuje kultivační profil bakterie po dobu 120 hodin v závislosti na O.D. _(600nm) kultury. Kontinuální kultivace *E. coli* probíhala v minimálním kultivačním mediu M9. Další parametry růstu bakterie v průběhu kultivace jsou znázorněny v následujícím obrázku (**Obr.16**).

Z **Obr.15** je patrné, že průběh kultivace v obou případech je velmi podobný a liší se pouze v mírně zvýšeném nárůstu kultury ve 103. hod u erytromycinu. Pro následující analýzy byly v označených (zakroužkovaných) časech kultivace odebrány zásobní kultury, které reprezentovaly fyziologický stav bakterie v daném časovém úseku. Jedná se o odběry v časech **43 hod**, **68 hod** a **103 hod** a to z obou kultivačních experimentů.

U těchto odběrů byly pak studovány i další fyziologické parametry buňky (**Obr.16**). Vzorky z odběrů 43 hod, 68 hod a 103 hod byly dále kultivovány jako tzv. „batch-kultivace“ a byla stanovena generační doba bakteriální populace. Z výsledků vyplývá, že doba zdvojení pro bakterie rostoucí bez přítomnosti antibiotika se pohybuje průměrně kolem 60 min a snižuje se ve 103. hod na 53 min. Při kultivaci *E. coli* s erytromycinem, je doba zdvojení podstatně vyšší kolem 83 min (vzorky 43 hod a 68 hod) a ve 103. hod se snižuje na hodnotu 60 minut jako v kontrolním experimentu. Při porovnání kultivace s a bez antibiotika je vidět, že přítomnost erytromycinu se negativně promítá do rychlosti růstu bakterie, ale po dlouhodobé kultivaci, a tím adaptaci bakterie na nové podmínky, se rozdíly začínají stírat.

OBR. 16.: Fyziologické parametry bakterie *E. coli* v průběhu kontinuální kultivace

Grafy znázorňují další fyziologické parametry bakterie *E. coli* v průběhu kontinuální kultivace v přítomnosti antibiotika erytromycinu (červená) či bez něj (zelená): vývoj generační doby (graf nahoře), vývoj syntézy elongačního faktoru EF-Tu (graf uprostřed) a vývoj relativní přesnosti translace pomocí reportérového luciferázového systému (graf dole).

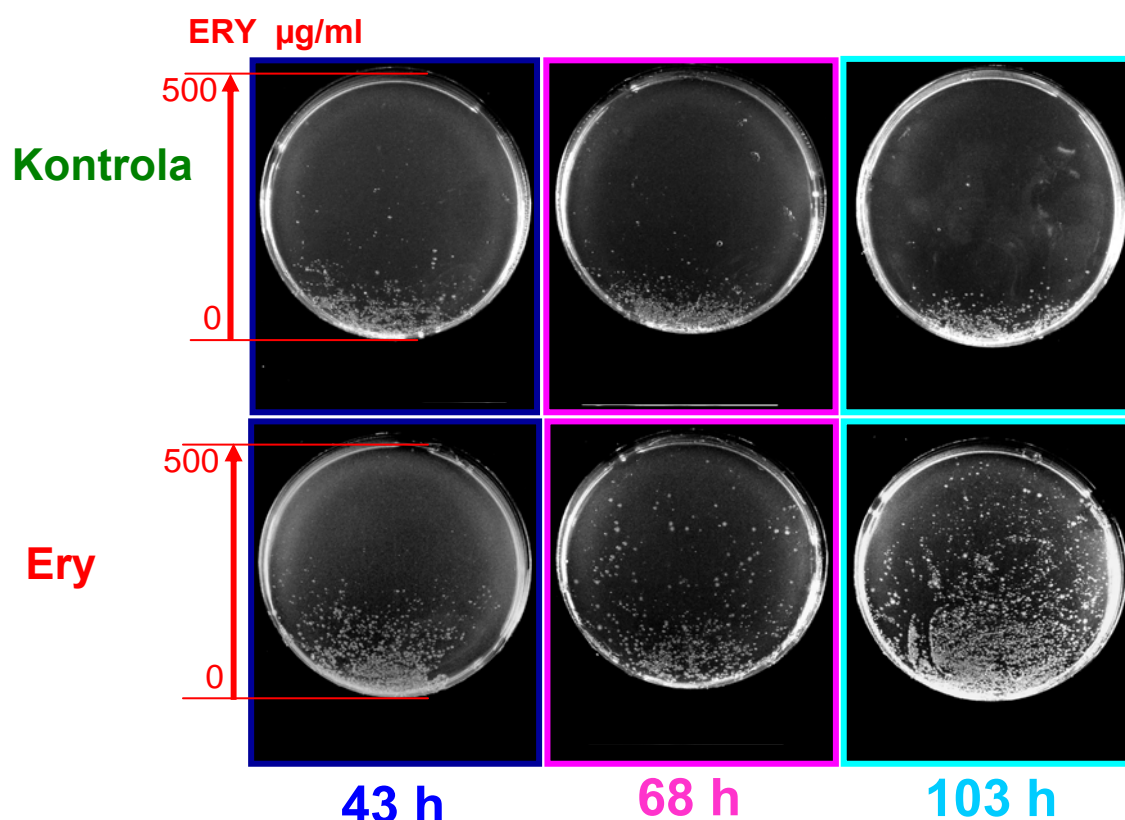
Důležitým parametrem byla i relativní rychlost translace (**Obr.16**), která ukazuje na výkonnost translačního systému v průběhu kultivace bakterie. Z radioaktivně značených proteomů byl vypočítán poměr syntetizovaného elongačního faktoru (EF-Tu) k celkovému množství syntetizovaných proteinů *E. coli* zachycených na gelu. Množství EF-Tu se významně zvyšuje u kultivace s erytromycinem s maximem v 68. hod. Shodných hodnot s kontrolou je dosaženo až ve 103. hodině kultivace. V 68. hodině kultivace s antibiotikem je tedy potřeba téměř 2x tolik EF-Tu faktoru, aby se vytvořilo stejné množství bílkovin jako ve stejný čas v kontrolní kultivaci.

Dalším sledovaným parametrem byla relativní přesnost translace. K měření přesnosti translace byl využit genový reportérový systém vytvořený na bázi bakteriální

luciferázy, který umožňuje měřit „nonsense“ stop kodon umístěný v proximální části *luxB* genu a jeho *supresi* (čtení jako smysluplný kodón). Vyšší luminiscence představuje vyšší počet translačních chyb, tedy nižší přesnost translace. **Obr.16** ukazuje hodnoty luminiscence bakterií naměřené v jednotlivých časech kultivace vyjádřenou jako podíl Rlu (relativní luminiscence) a O.D. (optické denzity). U kontrolní kultivace dochází ve 103. hod k poklesu hodnoty Rlu/O.D., tedy vyšší přesnosti translace. Trend u kultivace s antibiotikem je opačný, přesnost translace se v čase snižuje, zvyšuje se poměr Rlu/O.D. (Hájková 2007).

Dalším parametrem, který byl zásadní pro vyhodnocení experimentů, byla úroveň rezistence bakteriální populace k erytromycinu v průběhu kontinuální kultivace. Vliv selekčního tlaku antibiotika v průběhu kultivace na množství rezistentních buněk v jednotlivých vzorcích byl sledován pomocí gradientových ploten. Odebrané vzorky bakterií z jednotlivých časů (43 hod, 68 hod a 103 hod) byly následně kultivovány na pevné půdě, kde hladina antibiotika erytromycinu plynule stoupala od 0 do 500 µg/ml (**Obr.17**). Obrázek 17 ukazuje nárůst *E. coli* na plotnách z jednotlivých odběrových časů. U bakterií z kontrolní kultivace je nárůst patrný do maximální koncentrace antibiotika 100 µg/ml ve všech časech. Naproti tomu u kultury, která byla vystavena v průběhu kontinuální kultivace přítomnosti antibiotika, se v průběhu času počet vysoce rezistentních kmenů dramaticky zvyšuje.

Zjištěné změny fyziologických parametrů jsme konfrontovali se změnami v proteomech získaných z populací *E. coli* odebraných v jednotlivých časech kultivace. Izolované bílkoviny byly separovány pomocí 2-DE. Pro standardizaci a kvantifikaci experimentu bylo zvoleno radioaktivní *in vivo* značení bílkovin pomocí izotopu [³⁵S]-metioninu.

OBR. 17.: Antibiotikové gradientové plotny s nárůstem bakterie *E.coli*

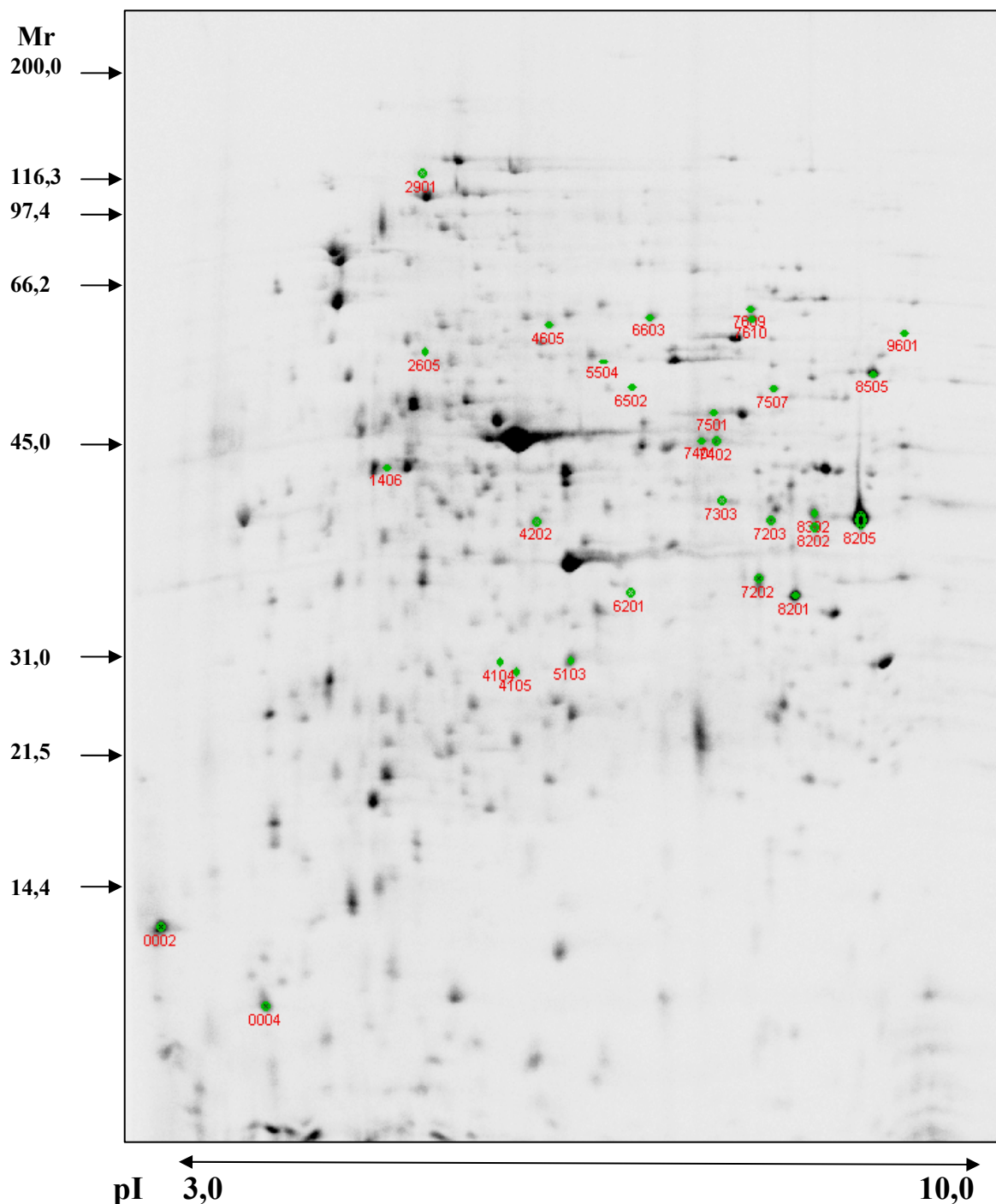
Obrázek znázorňuje nárůst *E. coli* na gradientových plotnách. Množství antibiotika erytromycinu na plotně vzrůstá od 0 do 500 µg/ml (ve směru šipky). Na plotny byly naočkovány kultury bakterie *E. coli* z jednotlivých časů kontinuální kultivace a to bez přítomnosti antibiotika (kontrola, „K“) a s přítomností erytromycinu („Ery“).

5.2.2. Analýza celkových proteinů *E. coli* pomocí 2-D elektroforézy

Zásobní kultury *E. coli* získané v průběhu kontinuální kultivace z odběrových časů 43 hod, 68 hod a 103 hod posloužily po krátké pre-kultivaci k izolaci celkových bílkovin bakterie. Vzhledem k tomuto kultivačnímu kroku bylo možné využít radioaktivní *in vivo* značení bílkovin pomocí izotopu [³⁵S]-metioninu a tím dosáhnout reprodukovatelné kvantifikace aktuálních proteinových změn.

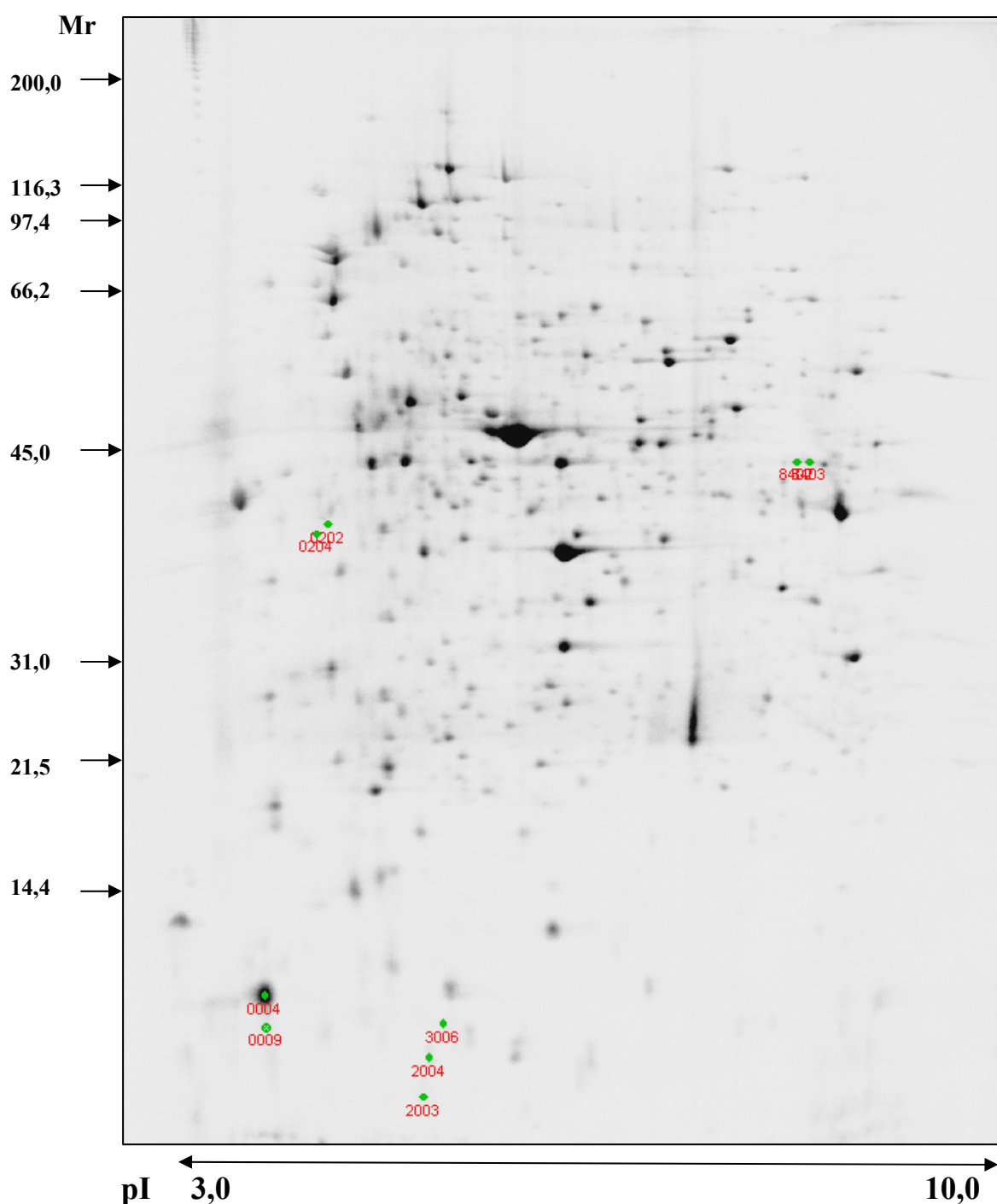
Vlastní dělení bylo provedeno na 12,5 % polyakrylamidových SDS gelech o rozměrech 22 x 22 cm („velké gely“) na aparatuře „Oxford Glycosystem Investigator“. První rozměr (IEF) probíhal na zařízení „Multiphor™ II Electrophoresis System“. Na gely bylo nanášeno přibližně 300 µg proteinů (Kap.4.8.3.).

OBR. 18.: Dvojrozměrná elektroforéza bílkovin *E.coli* - kontinuální kultivace – čas odběru: 43 hod. Radiogram s vyznačenými kvantitativními změnami.



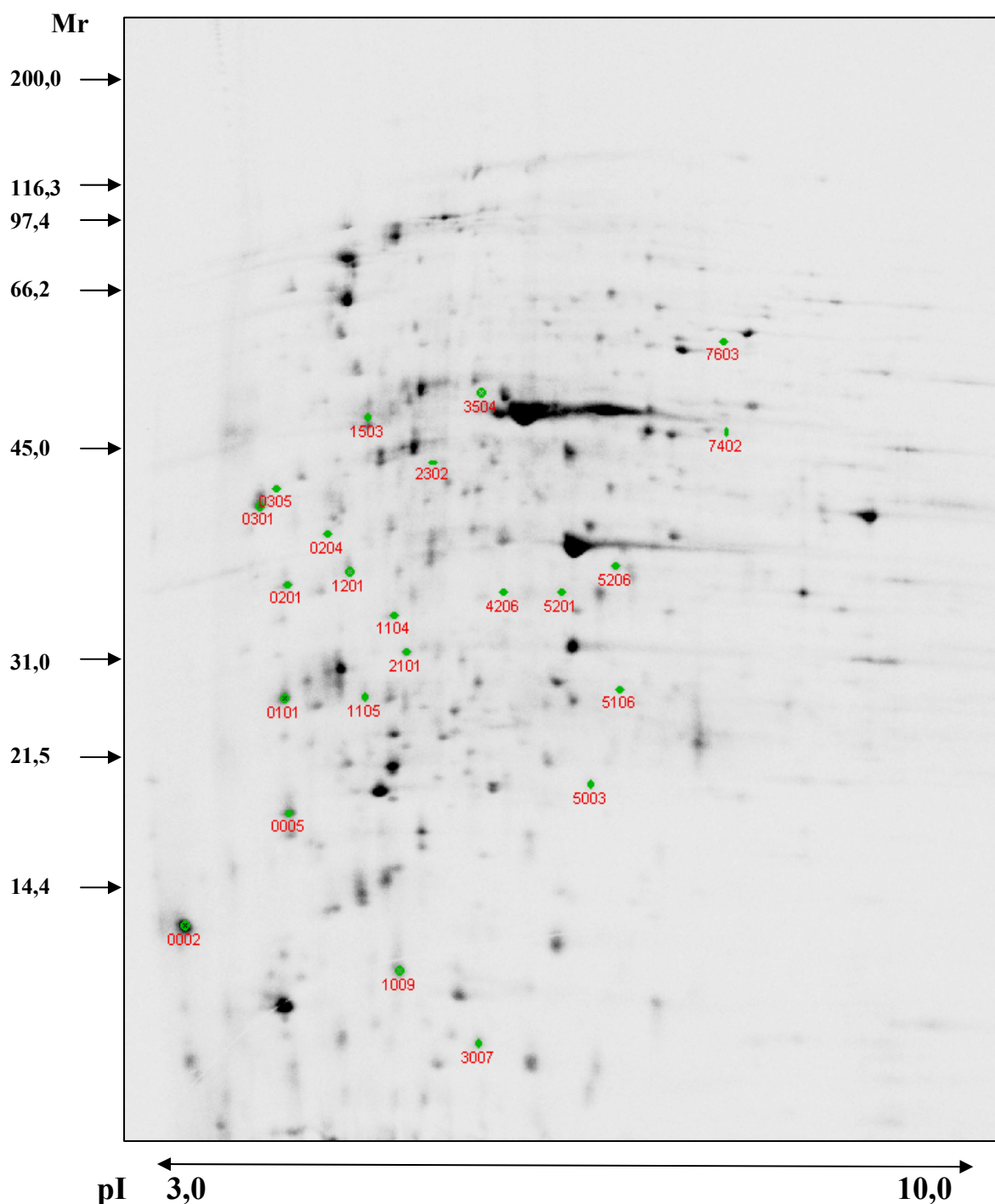
Reprezentativní proteom (radiogram) bakterie *E. coli* – kontinuální kultivace bakterie v mediu M9 v čase odběru **43 hod.** Byla provedena kvantitativní analýza mezi kultivacemi s a bez antibiotika. Výsledek analýzy je znázorněn v obrázku čísla *spotů* (SSP). Kvantifikace těchto *spotů* je znázorněna v grafu (**Obr.21**) a identifikace bílkovin je uvedena v **Tab.5**. Na gel bylo naneseno 300 µg proteinů. Pro separaci byly použity IPG *stripy* s gradientem v rozmezí pH 3-10 a 12,5% SDS-PAGE gely, proteiny byly *in vivo* značeny izotopem [³⁵S]-metioninu. Rozsah Mr (v tis.) a pI je označen v obrázku.

OBR. 19.: Dvojměrná elektroforéza bílkovin *E.coli* - kontinuální kultivace – čas odběru: 68 hod. Radiogram s vyznačenými kvantitativními změnami.



Reprezentativní proteom (radiogram) bakterie *E. coli* – kontinuální kultivace v mediu M9 v čase odběru **68 hod.** Byla provedena kvantitativní analýza mezi kultivacemi s a bez antibiotika. Výsledek analýzy je znázorněn v obrázku čísly *spotů* (SSP). Kvantifikace těchto *spotů* je znázorněna v grafu (**Obr.22**) a identifikace bílkovin je uvedena v **Tab.5**. Parametry pokusu jsou jinak stejné jako uvedeny pod **Obr.18**.

OBR. 20.: Dvojrozměrná elektroforéza bílkovin *E.coli* - kontinuální kultivace – čas odběru: 103 hod. Radiogram s vyznačenými kvantitativními změnami.



Reprezentativní proteom (radiogram) bakterie *E. coli* – kontinuální kultivace v mediu M9 v čase odběru **103 hod.** Byla provedena kvantitativní analýza mezi kultivacemi s a bez antibiotika. Výsledek analýzy je znázorněn v obrázku čísla spotů (SSP). Kvantifikace těchto spotů je znázorněna v grafu (**Obr.23**) a identifikace bílkovin je uvedena v **Tab.5**. Parametry pokusu jsou jinak stejné jako uvedeny pod **Obr.18**.

Vyhodnocení a srovnání gelů z jednotlivých časů a kultur (Obr.18, 19 a 20) bylo prováděno pomocí počítačového programu PDQuest 7.3.1. Gely byly *naskenovány* a jejich nasnímané obrazy byly dále hodnoceny.

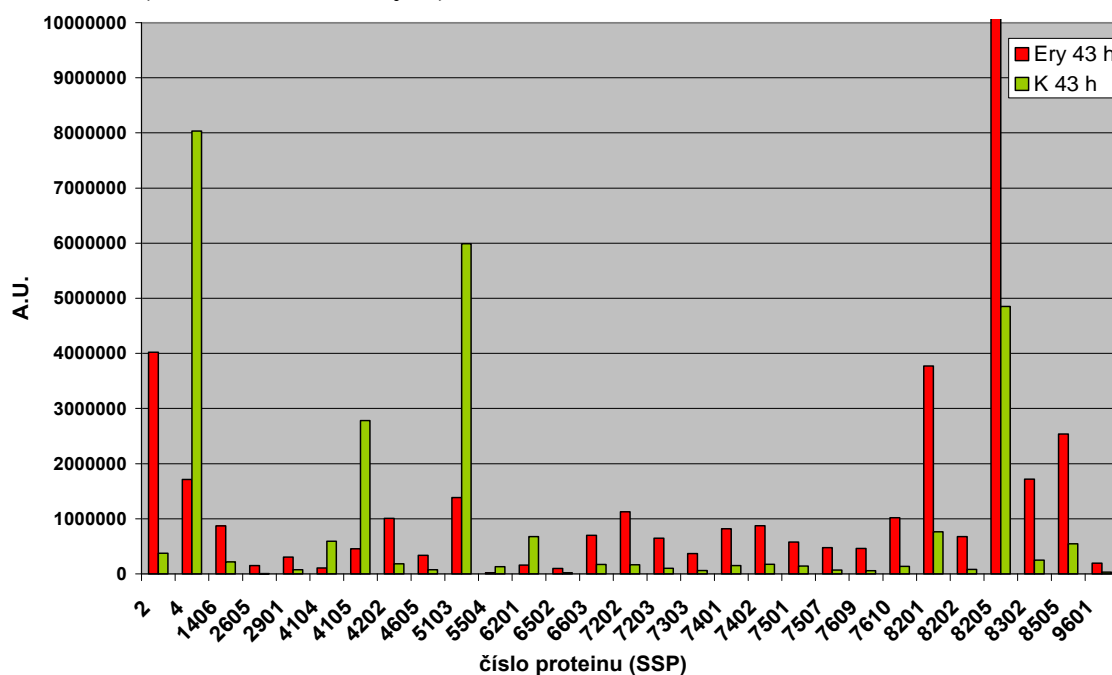
Srovnání celkového proteinového spektra bakterie *E. coli* kultivované kontinuálně bez či v přítomnosti antibiotika erytromycinu ukázalo několik významných změn v proteomu bakterie.

Celkově bylo na radiogramech detegováno průměrně 300 průkazných proteinových skvrn. Kvantitativní analýzy v programu PDQuest ukázaly desítky proteinů, u nichž dochází v průběhu kultivace ke změnám při srovnání kontrolní kultivací (bez přítomnosti antibiotika erytromycinu) s kulturami v přítomnosti erytromycinu v jednotlivých časech kontinuální kultivace (Obr.18, 19 a 20). Byly nalezeny i drobné kvalitativní změny v proteomech bakterie z jednotlivých kultivačních časů (Obr.26)

U vzorku ze **43. hod** kultivace s erytromycinem v porovnání s kontrolní kulturou ve stejném čase byly pozorovány podstatné kvantitativní změny v proteinové syntéze u **29 bílkovin** (Obr.18). Navíc syntéza u těchto vybraných proteinů byla minimálně 4krát vyšší či nižší vzhledem ke srovnávanému vzorku (kontrola). Přehledný graf kvantitativního zastoupení jednotlivých bílkovin je na Obr.21. U vzorku ze **68. hod** kultivace s erytromycinem v porovnání s kontrolní kulturou ve stejném čase byly pozorovány podstatné kvantitativní změny v proteinové syntéze pouze u **9 bílkovin** (Obr.19) a u vzorku ze **103. hod** kultivace se jednalo o **23 bílkovin** (Obr.20). Opět byly vybrány změny s faktorem 4x, tedy 4krát vyšší či nižší exprese vzhledem ke srovnávanému vzorku. Přehledný graf kvantitativního zastoupení vybraných bílkovin z **68. hod** je na Obr.22 a ze **103. hod** je na Obr.23. Tyto proteiny byly následně identifikovány hmotovou spektrometrií MALDI-TOF a jejich podrobný přehled je uveden v Tab.5.

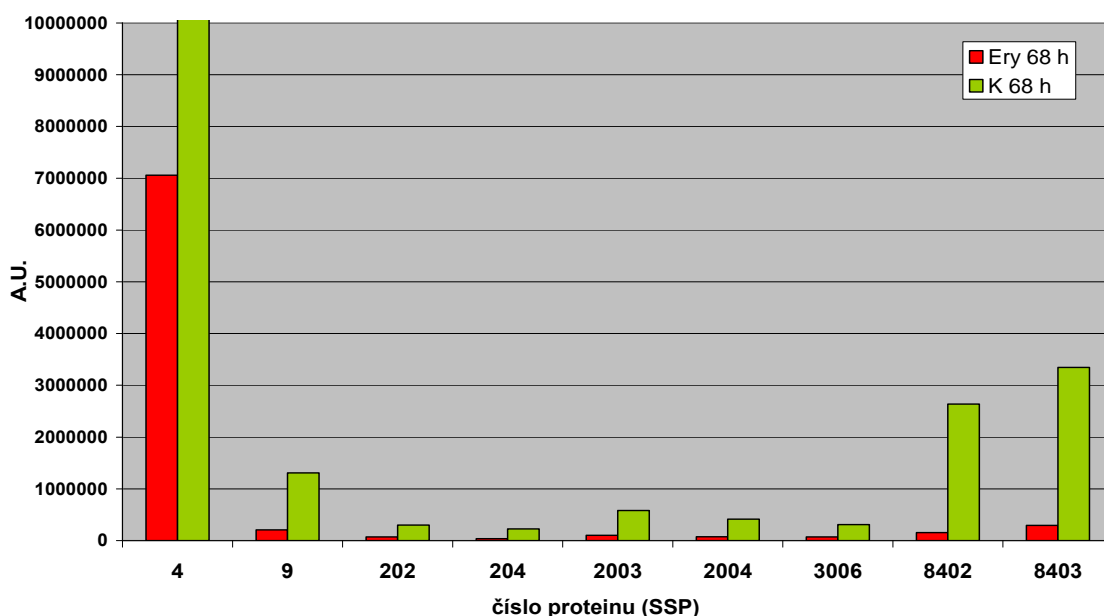
Pro větší přehlednost změn v zastoupení jednotlivých bílkovin v průběhu kontinuální kultivace byly zjištěné proteiny vyneseny společně do grafů (Obr.24 a 25). Tyto grafy ukazují závislost množství (kvantity) sledovaných proteinů v jednotlivých časech kultivace s erytromycinem (Obr.25) a u kontrolního experimentu (Obr.24).

OBR. 21.: Intenzity vybraných proteinů ve 43. hod kontinuální kultivace *E. coli* (kvantitativní analýza)



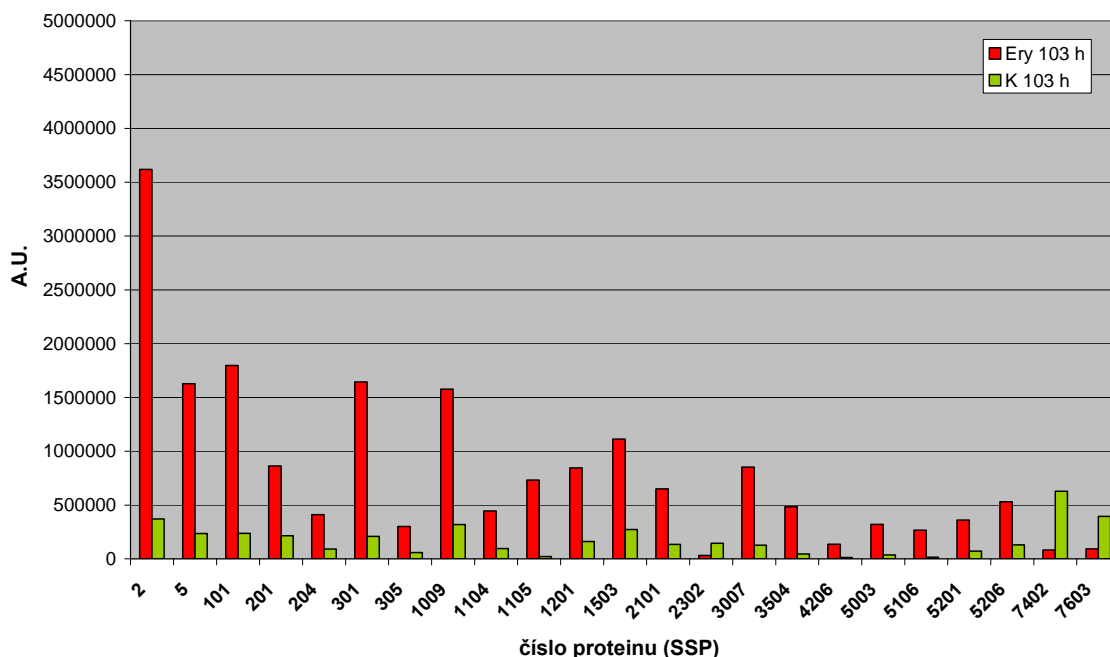
Graf znázorňuje kvantitativní zastoupení vybraných bílkovin ve **43. hod** kontinuální kultivace v přítomnosti erytromycinu (červené sloupce) a bez antibiotika (zelené sloupce). Kvantita je uvedena v bezrozměrných jednotkách (A.U., Arbitrary Units) jako velikost plochy, kterou zaujímá *spot* na gelu (integrováno a normalizováno programem PDQuest). Čísla *spotů* odpovídají číslům proteinů na odpovídajícím gelu (Obr.18).

OBR. 22.: Intenzity vybraných proteinů v 68. hod kontinuální kultivace *E. coli* (kvantitativní analýza)



Graf znázorňuje kvantitativní zastoupení vybraných bílkovin v **68. hod** kontinuální kultivace v přítomnosti erytromycinu (červené sloupce) a bez antibiotika (zelené sloupce). Parametry grafu stejné jako uvedeny pod **Obr.21**. Čísla *spotů* odpovídají číslům proteinů na odpovídajícím gelu (Obr.19).

OBR. 23.: Intenzity vybraných proteinů ve 103. hod kontinuální kultivace *E. coli* (kvantitativní analýza)

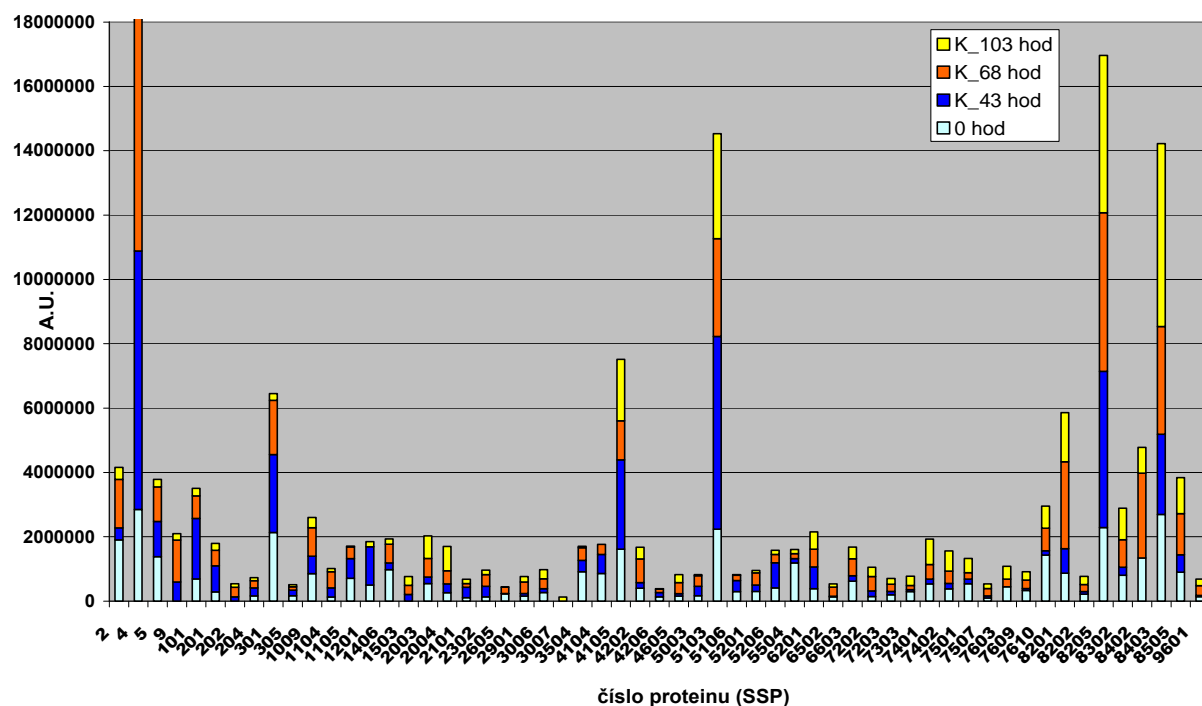


Graf znázorňuje kvantitativní zastoupení vybraných bílkovin ve **103. hod** kontinuální kultivace v přítomnosti erytromycinu (červené sloupce) a bez antibiotika (zelené sloupce). Parametry grafu stejné jako uvedeny pod **Obr.21**. Čísla *spotů* odpovídají číslům proteinů na odpovídajícím gelu (**Obr.20**).

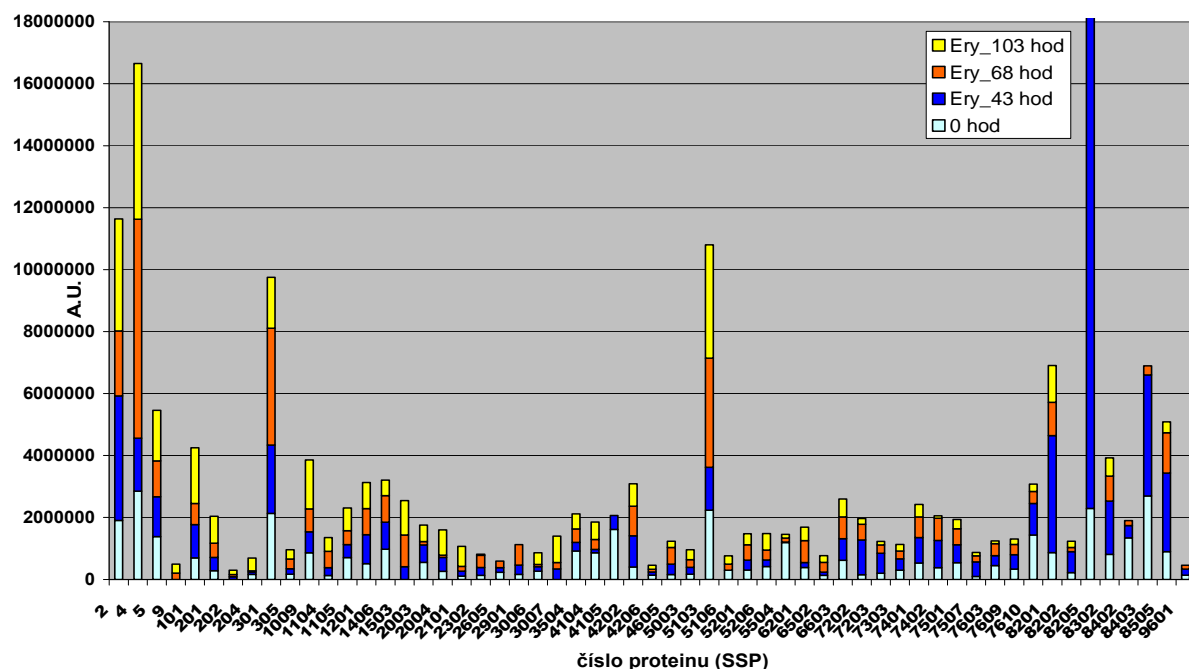
Poměrně rozsáhlé kvantitativní rozdíly byly doprovázeny i malými změnami zjištěnými při kvalitativní analýze. Tato analýza zahrnuje proteiny, které v nějakém čase kontinuální kultivace chybí. Celkově se jednalo o 12 proteinových změn. Zajímavý průběh mají proteiny SSP 4105 a 8403, které jsou zastoupeny v kontrole a naopak při kultivaci v přítomnosti antibiotika mizí. 3 proteiny byly detegovány na gelech s erytromycinem a to jen ve 43. a 68. hodině. Mnoho proteinů v této analýze také nebylo syntetizováno ve 103. hod kultivace s antibiotikem. Přehledně jsou změny v jednotlivých časech znázorněny na **Obr.26**.

Zjištěné proteinové změny byly následně na servisním pracovišti identifikovány pomocí hmotové spektrometrie MALDI-TOF. Souhrnný přehled je uveden v tabulce **Tab.4**.

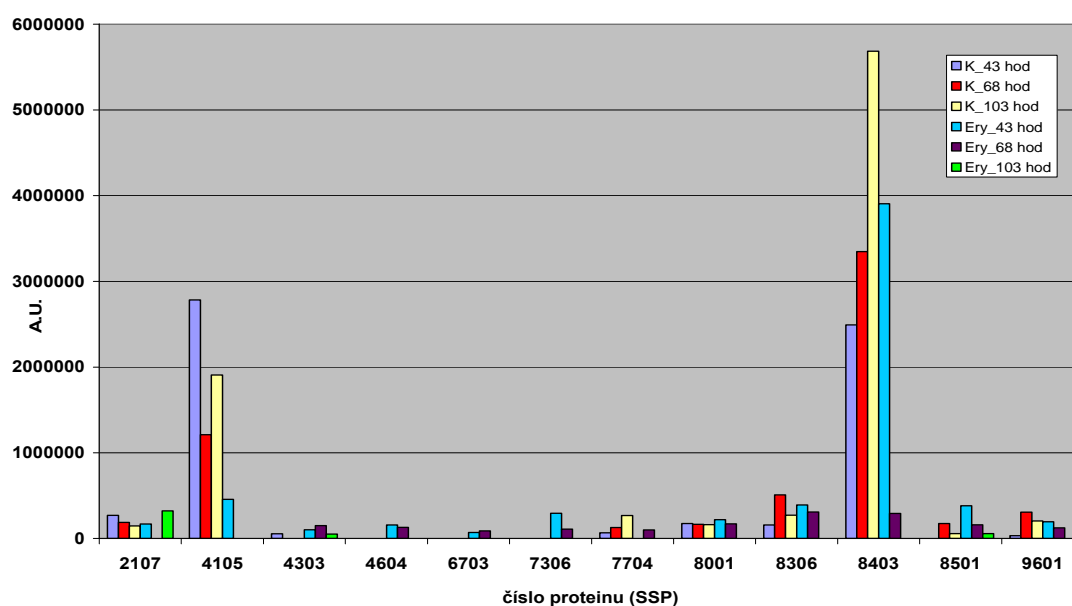
OBR. 24.: Kvantitativní analýza proteinových změn u *E. coli* v průběhu její kontinuální kultivace bez přítomnosti antibiotika – kontrola



OBR. 25.: Kvantitativní analýza proteinových změn u *E. coli* v průběhu její kontinuální kultivace v přítomnosti antibiotika erytromycinu



Grafy znázorňují kvantitativní zastoupení všech vybraných bílkovin (faktor 4x) v průběhu kontinuální kultivace a to bez antibiotika (**Obr.24**), či v přítomnosti erytromycinu (**Obr.25**). Parametry grafů stejné jako uvedeny pod **Obr.21**.

OBR. 26.: Intenzity vybraných proteinů *E. coli* po kvalitativní analýze

Graf znázorňuje zastoupení vybraných unikátních bílkovin z kvalitativní analýzy. Barevně je odlišen typ a čas kultivace (viz legenda v grafu). Kvantita proteinů je uvedena v bezrozměrných jednotkách (A.U., Arbitrary Units) jako velikost plochy, kterou zaujímá *spot* na gelu (integrováno a normalizováno programem PDQuest).

TAB.4.: Identifikace unikátních stresových proteinů *E. coli* pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (kvalitativní analýza, Obr.26)

SSP	název proteinu	Označení proteinu	Funkce	Počet peptidů	Pokrytí (%)	Mr (tis.)	pI
2107	Transcriptional regulatory protein phoP	PHOP_ECO57	Transcription factors	11	54	25	5,0
	2-keto-4-pentenoate hydratase	MHPD	Amino Acid Metabolism	9	41	29	5,1
	Aerobic respiration control protein arcA	ARCA_ECO57	Signal Transduction	7	33	27	5,2
4105	Beta-lactamase TEM	BLAT_ECOLX	Signal Transduction	19	63	31	5,7
	Outer membrane protein A	OMPA	Signal Transduction	6	23	37	6,0
	Protease 7	OMPT	Signal Transduction	12	40	36	5,8
4303	Aspartate--ammonia ligase	ASNA	E-Ligases	12	46	37	5,5
4604	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	ODO2	Carbohydrate Metabolism	16	45	44	5,6
6703	DNA gyrase subunit B	GYRB	DNA replication proteins	19	35	90	5,7
7704	ATP-dependent protease La	LON	Heat shock proteins	13	20	87	6,0

8501	Citrate synthase	CISY	Carbohydrate Metabolism	9	24	48	6,2
7306	Lactose operon repressor	LACI	Carbohydrate Metabolism	11	41	39	6,4
8306	Lactose operon repressor	LACI	Carbohydrate Metabolism	11	41	39	6,4
8403	Lactose operon repressor	LACI	Carbohydrate Metabolism	16	57	39	6,4
	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase	PDXB	E-Oxidoreductases	17	50	41	6,2
9601	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component	CYSI_E CO24	E-Oxidoreductases	15	33	64	7,3

Tabulka uvádí identifikované proteinové *spoty* bakterie *E. coli* (pokud není uvedeno jinak) po kvalitativní analýze (**Obr.26**), jejich název a označení, počet peptidů shodných s identifikovaným proteinem, faktor pokrytí („coverage“ faktor, spolehlivosti měření) a teoretické hladiny Mr (v tis.) a pI. **Barevně je vyznačena funkční příslušnost proteinů.**

Výše uvedená srovnávací proteomová studie doplnila zjištěné změny fyziologických parametrů a ukázala, jak rozsáhlé změny na proteinové úrovni doprovázejí změny ve fyziologii populace *E. coli* vystavené dlouhodobé kultivaci v chemostatu v přítomnosti erytromycinu. Výsledkem kvantitativní analýzy byla identifikace celkově 61 bílkovin, které se v průběhu kontinuální kultivace *E. coli* mění. Pouze 4 proteiny byly „překryvné“, tedy zjištěny ve více vzorcích.

TAB.5.: Identifikace stresových proteinů *E.coli* pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (kvantitativní analýza, Obr.21-23)

SSP	název proteinu	Označení proteinu	Funkce	Počet peptidů	Pokrytí (%)	Mr	pI
43 hodina kultivace							
0002	Acyl carrier protein	ACP	E-Oxidoreductases	2(3)	32(34)	9	4,0
0004*	Type-1 fimbrial protein, A chain	FIMA1	Bacterial motility proteins	5	60	18	5,1
1406	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	RPOA	Transcription	16	53	37	5
2605	Asparaginyl-tRNA synthetase	SYN	Translation	16	39	53	5,2
2901	Aconitate hydratase 2	ACON2	Carbohydrate Metabolism	18	21	93	5,2
4104/4105*	Protease 7	OMPT	Signal Transduction	12	40	36	5,8
	Outer membrane protein A	OMPA	Signal Transduction	6	23	37	6,0
	Beta-lactamase TEM	BLAT_ECOLX	Signal Transduction	19	63	31	5,7

4202	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	GHRB	Carbohydrate Metabolism	10	34	35	5,5
4605	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	AHPF	E-Oxidoreductases	16	39	56	5,5
	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	Carbohydrate Metabolism	10	27	56	5,6
5103*	Outer membrane protein A	OMPA	Signal Transduction	12	44	37	6,0
5504*	Xaa-Pro dipeptidase	PEPQ	E-Hydrolases	16	42	50	5,6
6201*	Methionine aminopeptidase	AMPM	E-Hydrolases	13	59	29	5,6
6502	Adenylosuccinate lyase	PUR8	Nukleotide Metabolism	15	33	52	5,7
6603	Pyruvate kinase I	KPYK1	Carbohydrate Metabolism	16	43	51	5,8
7202	Dihydrodipicolinate synthase	DAPA	Amino Acid Metabolism	9	42	31	6,0
7203	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Phe-sensitive	AROG	Amino Acid Metabolism	12	43	38	6,1
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	G3P1	Carbohydrate Metabolism	8	37	36	6,6
7303	L-threonine 3-dehydrogenase	TDH	Amino Acid Metabolism	12	43	37	5,9
	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	SYFA	Translation	7	28	37	5,8
7401	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	CARA	Nukleotide Metabolism	11	48	41	5,9
7402	Cysteine desulfurase	ISCS	Amino Acid Metabolism	15	38	45	5,9
	Protein tolB	TOLB	Signal Transduction	4	12	46	7,0
7501	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	SERA	Carbohydrate Metabolism	11	29	44	6,0
	Serine hydroxymethyltransferase	GLYA	E-Transferases	9	24	45	5,9
	Queuine tRNA-ribosyltransferase	TGT	E-Transferases	5	16	43	6,0
7507	Bifunctional protein glmU	GLMU	E-Transferases	14	33	49	6,1
7609	Fumarate hydratase class I, aerobic	FUMA	Carbohydrate Metabolism	13	31	60	6,1
7610	Anthranilate synthase component II	TRPG	Amino Acid Metabolism	23	56	57	6,0
8201	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	SUCD	Carbohydrate Metabolism	10	47	30	6,3
8202	Tryptophanyl-tRNA synthetase	SYW	Translation	17	56	37	6,3
8205	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	G3P1	Carbohydrate Metabolism	17	58	36	6,6
8302	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	G3P1	Carbohydrate Metabolism	14	50	36	6,6
	HTH-type transcriptional repressor purR	PURR	Transcription factors	8	29	38	6,3
8505	Transcription termination factor Rho	RHO	Transcription factors	16	44	47	6,8

	Biotin carboxylase	ACCC	Carbohydrate Metabolism	10	25	49	6,7
9601	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GLPD	E-Oxidoreductases	24	50	57	7
68 hodina kultivace							
0004*	Type-1 fimbrial protein, A chain	FIMA1	Bacterial motility proteins	5	60	18	5,1
0009*	Type-1 fimbrial protein, A chain	FIMA1	Bacterial motility proteins	4	50	18	5,1
0202/0204*	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	POTD	Membrane Transport	9	31	39	5,2
2003*	Universal stress protein A	USPA	Signal Transduction	6	41	16	5,1
2004*	10 kDa chaperonin	CH10	Heat shock proteins	5	47	10	5,2
3006*	30S ribosomal protein S6	RS6	Translation	7	49	16	4,9
8402*	Nicotinate phosphoribosyltransferase	PNCB	E-Transferases	19	49	46	6,1
8403*	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase	PDXB	E-Oxidoreductases	17	50	41	6,2
	Lactose operon repressor	LACI	Carbohydrate Metabolism	16	57	39	6,4
103 hodina kultivace							
0002	Acyl carrier protein	ACP	E-Oxidoreductases	2(3)	32(34)	9	4,0
0005	Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component	PTGA	Carbohydrate Metabolism	9	59	18	4,7
0101	Fe/S biogenesis protein nfuA	NFUA	Chaperones and folding catalysts	5	26	21	4,5
0201	Uncharacterized protein yceD	YCED	X uncharacterized protein	6	26	19	4,5
0204	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	POTD	Membrane Transport	9	33	39	5,2
0301	Outer membrane protein C	OMPC	Signal Transduction	19	68	40	4,6
1009	Putative peroxiredoxin bcp	BCP_EC O57	E-Oxidoreductases	8	51	18	5,0
	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	DUT_EC O24	Nukleotide Metabolism	5	43	16	4,9
1104	Agmatinase	SPEB	E-Hydrolases, Arginine and Proline Metabolism	11	48	34	5,1
1105	MltA-interacting protein	MIPA	Outer Membrane Protein	12	76	28	5,5
1201	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	FABD	Lipid Metabolism	12	65	32	5,0
1503	Alkanal monooxygenase alpha chain	LUXA_VI BHA	X Bioluminescence <i>V.harvei</i>	18	52	40	5,0
2101	Histidine-binding periplasmic protein	HISJ	Membrane Transport	8	39	28	5,5
2302	UTP--glucose-1-phosphate	GALU	Carbohydrate	12	55	33	5,1

	uridylyltransferase		Metabolism				
3007	30S ribosomal protein S6	RS6_EC O27	Translation	9	65	15	5,3
	50S ribosomal protein L17	RL17	Translation	3	24	14	11,1
3504	Enolase	ENO_EC O24	Carbohydrate Metabolism	13	47	46	5,3
4206	Spermidine synthase	SPEE	E-Transferases	10	55	32	5,3
5003	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	CLPP	E-Hydrolases	7	36	23	5,5
5106	NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	YDFG	E-Oxidoreductases	8	45	27	5,7
5201	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	DAPD	Amino Acid Metabolism	13	63	30	5,6
5206	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	GALF	Carbohydrate Metabolism	10	49	33	5,7
7402*	Cysteine desulfurase	ISCS	Amino Acid Metabolism	20	48	45	5,9
	Protein tolB	TOLB	Signal Transduction	4	12	46	7,0
7603*	ATP synthase subunit alpha	ATPA	E-Hydrolases	20	42	55	5,8

Tabulka uvádí identifikované proteinové *spoty* bakterie *E. coli* (pokud není uvedeno jinak), jejich název a označení, počet peptidů shodných s identifikovaným proteinem, faktor pokrytí („coverage“ faktor, spolehlivosti měření) a teoretické hladiny Mr (v tis.) a pI. Tabulka je rozdělena na 3 celky dle odběrového času. První celek patří k analýze ve 43. hod (gel na **Obr.18** a graf na **Obr.21**), druhý celek odpovídá analýze v 68. hod (gel na **Obr.19** a graf na **Obr.22**) a poslední celek patří k analýze ve 103. hod kultivace (gel na **Obr.20** a graf na **Obr.23**). Zvýšená syntéza v kontrolní kultivaci vzhledem k erytromycinu označena hvězdičkou (*).

Barevně je vyznačena funkční příslušnost proteinů.

5.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie

Další projekt byl vypracováván ve spolupráci s Klinikou dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol.

Naše část projektu byla zaměřená na analýzu dodané kostní plazmy (**KP**) od dětí s diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií (**ALL**) pomocí 2-D elektroforézy. Kostní plazma podobně jako krevní plazma je specifický vzorek s vysokým podílem několika málo proteinů, které tvoří její podstatnou část. Naším cílem bylo upravit vzorek tak, aby jeho analýza byla efektivní a výsledné profily dávaly smysluplný obraz kostní plazmy.

K tomuto účelu byly vybrány dva nezávislé přístupy, které komplexnost plazmy snižují a umožňují tak snadnější separaci bílkovin. Jednalo se o „imunodepleční“ techniku a „pre-frakcionaci“ vzorku.

5.3.1. „Imunodeplece“

„Imunodepleční“ přístup znamenal cílené vychytání *abundantně* (majoritně) zastoupených bílkovin v plazmě. Protože složení krevní plazmy je velmi podobné složení kostní plazmy, nebyl problém s použitím komerčně dodávaného systému na vychytání 12 *abundantně* zastoupených bílkovin.

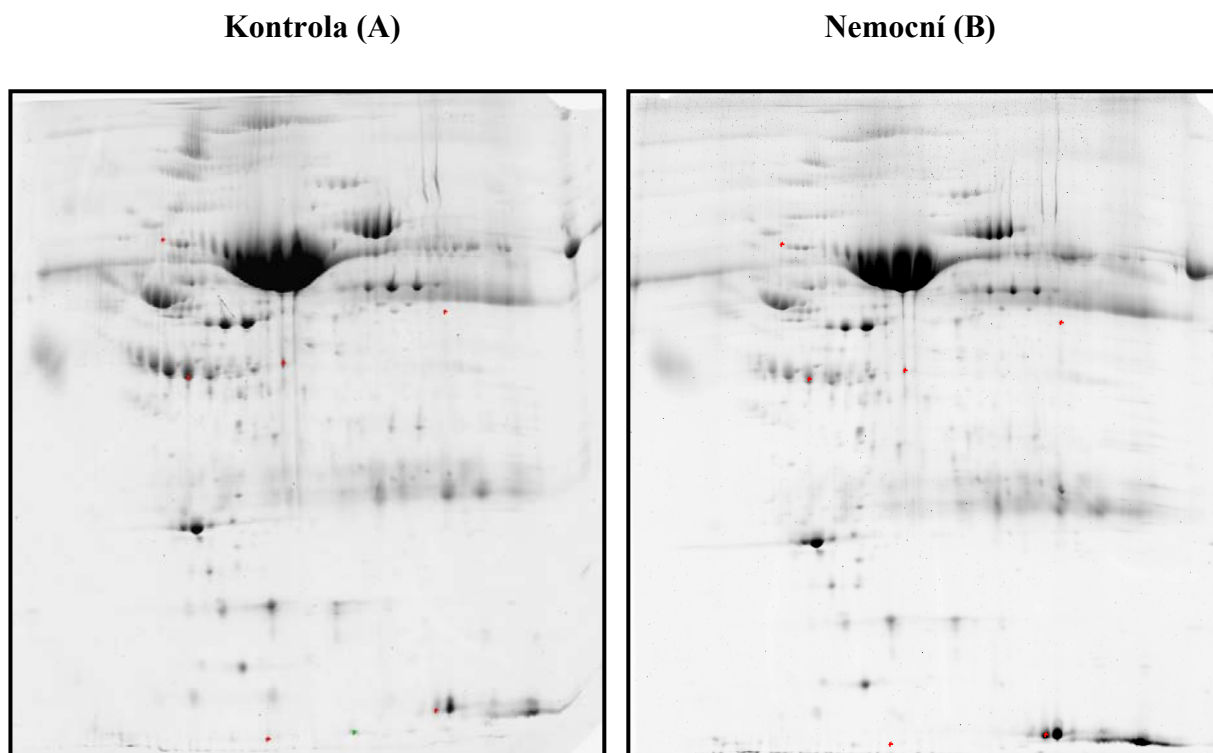
Systém **ProteomeLab IgY-12** od firmy Beckman Coulter umožňuje zachytit bílkoviny - albumin, IgG, transferin, fibrinogen, IgA, $\alpha 2$ makroglobulin, IgM, $\alpha 1$ antitrypsin, haptoglobin, $\alpha 1$ glykoprotein, apolipoprotein A1, apolipoprotein A2. Získané frakce byly analyzovány 2-DE a významné změny v proteomech byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

5.3.1.1. Kostní plazma – celkový proteinový profil

Pro získání komplexního obrazu kostní plazmy byl jako první analyzován celkový vzorek kostní plazmy (bez úprav) pomocí 2-D elektroforézy. Vzorek kostní plazmy byl pouze pročištěn pomocí srážení v TCA (6%), byla v něm změřena koncentrace bílkovin a následně byl standardně analyzován pomocí 2-DE (**Kap.4.6.3**).

Výsledný bílkovinný profil je vidět na **Obr.27**. Vždy byly sledovány a porovnávány dvě situace: vzorek od nemocných (pacientů), tedy směs kostní plazmy od 5 dětských dárců, u kterých byla diagnostikována ALL, a vzorek kontrolní, který také obsahoval směs 5 dárců prokazatelně bez maligního onemocnění, jenž byli minimálně 1 rok po transplantaci kostní dřeně.

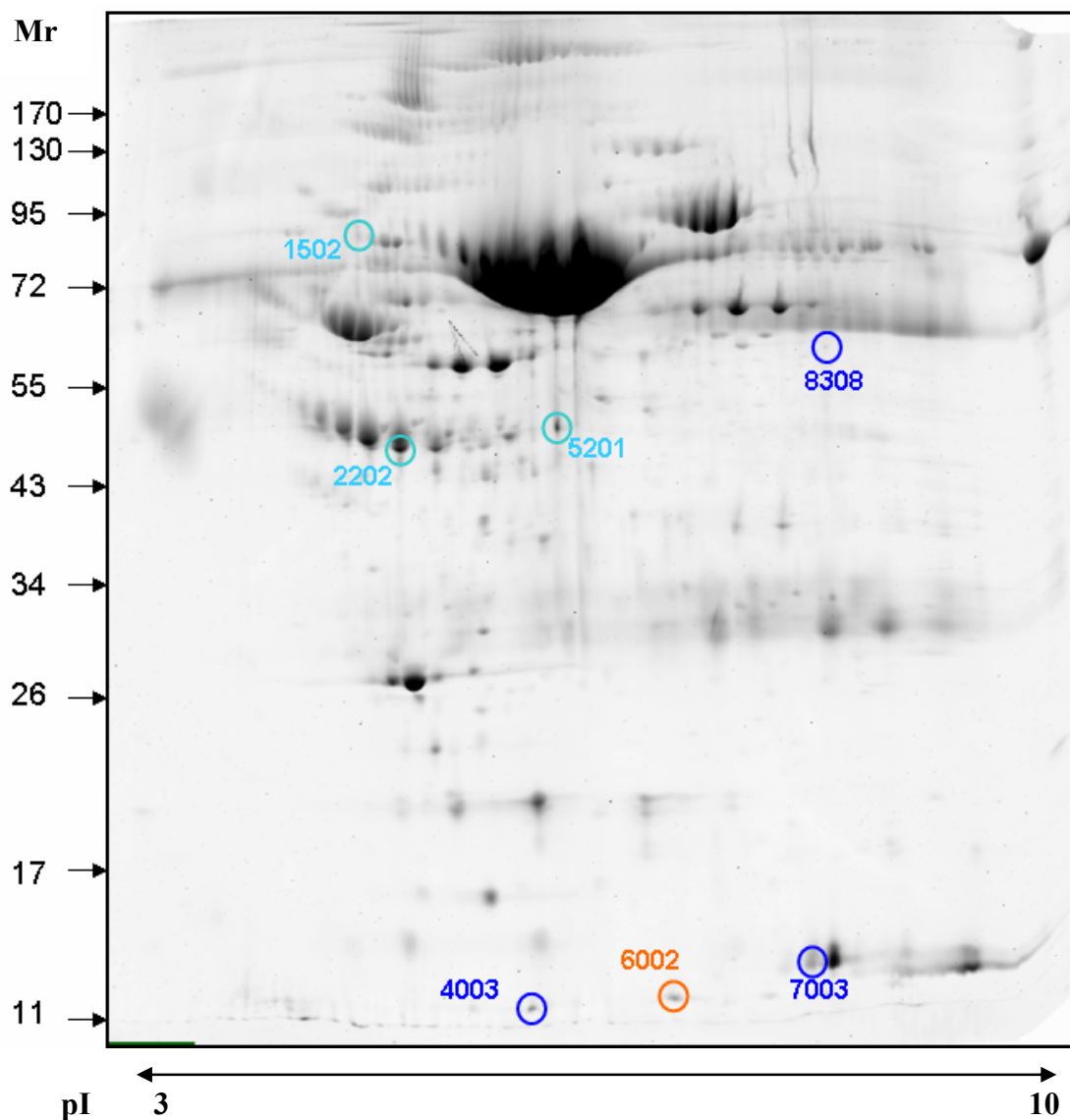
Tyto dva profily byly následně hodnoceny pomocí počítačového programu PDQuest 7.3.1. Výsledky analýzy ukazuje **Tab.6** a graficky jsou rozdíly dobře porovnatelné na **Obr. 28 a 29**.

OBR. 27.: Celkový proteinový profil lidské kostní plazmy

Reprezentativní proteom lidské kostní plazmy – vzorek nemocných **(B)** (směs od 5 pacientů s diagnostikovaným maligním onemocněním) a kontrolní vzorek **(A)** (směs od 5 pacientů po úspěšné transplantaci kostní dřeně). Na gel bylo naneseno 200 µg proteinů. Pro separaci byly použity IPG *stripy* s pH gradientem v rozmezí pH 3-10 a 12,5% SDS-PAGE gely, proteiny byly na gelu detegovány fluorescenční barvou SYPRO Ruby. Na gelech byly červeně označeny proteiny, kde se vzorky nemocných liší od kontrolních (pro detail viz **Obr.28**).

Celkově bylo pomocí fluorescenční barvy SYPRO Ruby detegováno na jednotlivých gelech přibližně 260 spotů, což je v porovnání s jinými typy vzorků, zejména mikrobiálními, docela málo. Bylo to způsobeno právě vysokou koncentrací 12 *abundantních* bílkovin, které nejen zastiňují méně zastoupené bílkoviny, ale vzhledem k limitům pro dobrou separaci bílkovin pomocí 2-DE, neumožňují ani navýšení nanášky proteinů na gel.

OBR. 28.: Proteom kostní plazmy s vyznačenými změnami v syntéze bílkovin mezi vzorkem nemocných a kontrolou

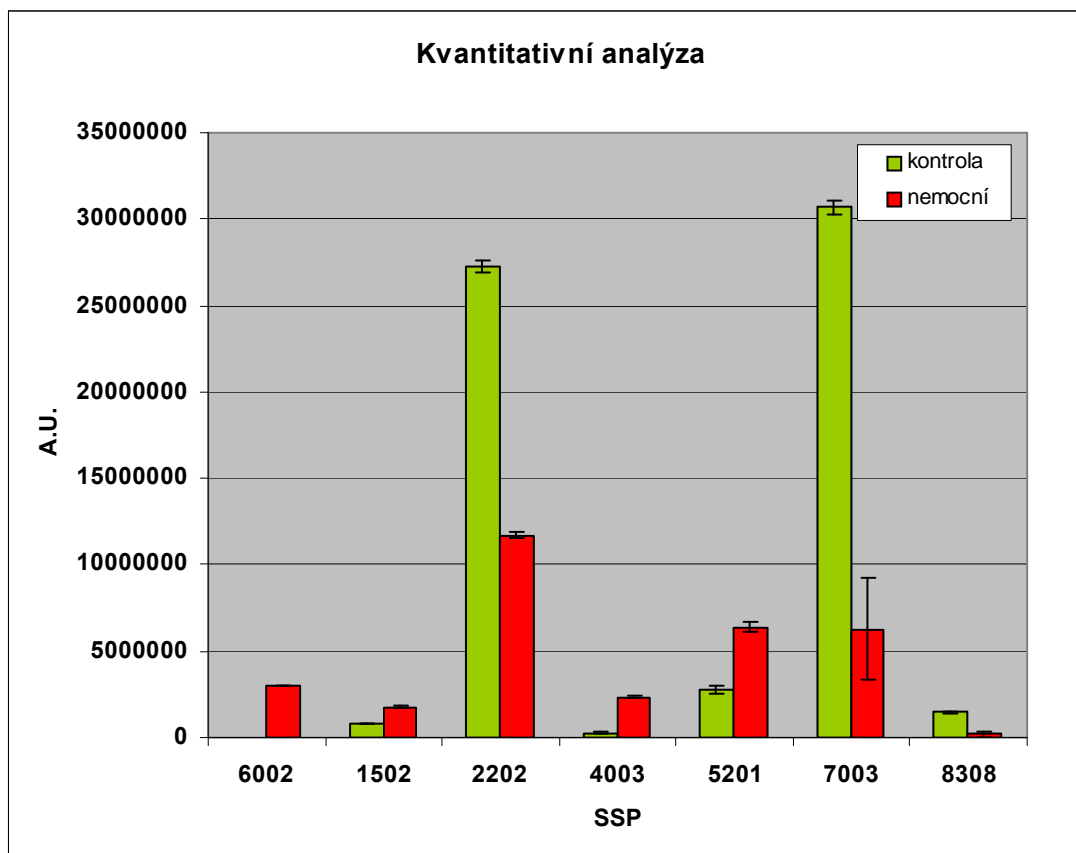


Proteom lidské kostní plazmy s vyznačenými změnami mezi vzorkem nemocných a kontrolním vzorkem. Na gel bylo nanášeno 200 µg proteinů. Separace probíhala na IPG *stripech* s pH gradientem v rozmezí pH 3-10 (vyznačeno v dolní části obrázku), standardy molekulových hmotností (v tis.) jsou zobrazeny v levé části obrázku. Bílkoviny byly detegovány fluorescenční barvou SYPRO Ruby. Změny v syntéze bílkovin mezi kontrolou a nemocnými jsou barevně rozlišeny – světle modře (syntéza zvýšena/snížena 2x), tmavě modře (syntéza zvýšena/snížena 4x), oranžově (unikátní protein). Detailní hodnoty změn jsou uvedeny v **Tab.6** a **Obr.29**.

TAB.6.: Kvantitativní analýza celkového proteinového profilu kostní plazmy

	Kontrola		Nemocní	
SSP (číslo spotu)	A.U. (intenzita spotu)	směrodatná odchylka	A.U. (intenzita spotu)	směrodatná odchylka
6002			3002487	53501
1502	806385	4264	1778935	35124
2202	27274268	373778	11707013	133413
4003	284984	65547	2350698	75472
5201	2726583	225113	6376466	303603
7003	30679645	430187	6275401	2932041
8308	1480189	68150	184840	156580

Tabulka shrnuje změny v bílkovinném spektru mezi vzorkem nemocných a kontrolou. V tabulce je uvedeno číslo proteinu (SSP) společně s průměrnou intenzitou *spotu* ze 4 nezávislých gelů. Barevně jsou zvýrazněny *spoty*, u nichž jsou rozdíly v kvantitě mezi proteomy – světle modré jsou proteiny, jejichž intenzita je minimálně 2x vyšší či nižší (faktor 2x), u tmavě modrých proteinů je faktor 4x (zvýšení či snížení až 4x), oranžový protein je unikátní (detegovaný pouze v proteomu nemocných). Grafické vynesení viz Obr.29.

OBR. 29.: Grafické znázornění intenzity *spotů* vybraných proteinů kostní plazmy (Tab.6)

Výsledné proteomy nemocných a kontroly byly nicméně podrobeny počítačové analýze a byly zjištěny kvantitativní i kvalitativní rozdíly u 7 proteinů. Protein SSP 6002 byl detegován pouze u vzorků nemocných. U 3 proteinů byla syntéza zvýšena/snížena 4x; u proteinu SSP 4003 šlo o zvýšení syntézy u nemocných, u dalších dvou proteinů SSP 7003 a 8308 se jednalo o snížení. Další 3 proteiny byly zvýšeny/sníženy pouze 2x a to zvýšeny u nemocných u SSP 1502 a 5201 a sníženy u SSP 2202.

Výsledky ukázaly nutnost použití „deplečního“ kroku při analýze kostní plazmy ke zvýšení citlivosti metody.

5.3.1.2. Kostní plazma – „depletovaná“ frakce (bez albuminu a dalších 11 majoritních bílkovin)

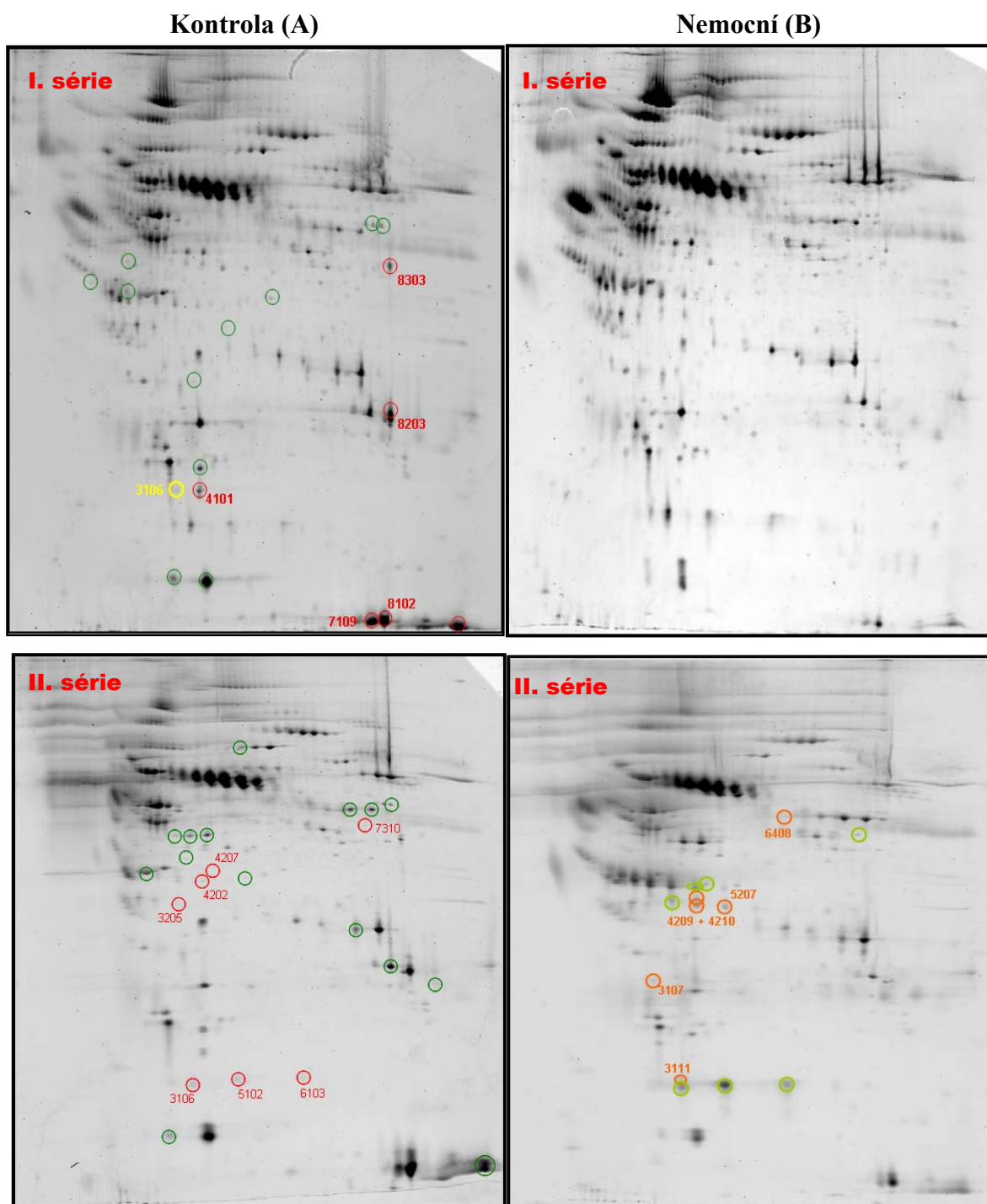
V následující etapě pokusů byl přidán „depleční“ krok, který pomocí centrifugačních kolonek „Proteome Lab IgY 12“ odstranil 12 vysoce zastoupených bílkovin v kostní plazmě (**Kap.4.6.3.1.**). Tento krok umožnil vyšší nanášky na gel a tím také lepší detekci málo zastoupených proteinů kostní plazmy.

Navíc vzhledem k očekávané variabilitě vzorků, byly připraveny 2 nezávislé série, které měly ukázat, jak velká je odlišnost jednotlivých směsných vzorků. Bylo tak možno identifikovat změny mezi nemocnými a kontrolou (překryvné) i změny v rámci jedné série (specifické).

Reprezentativní proteomy kontrolních vzorků a vzorků ze souboru nemocných jsou zobrazeny na **Obr.30**. Vybrané změny mezi kontrolou a nemocnými, a to jak rozdíly překryvné tak specifické, jsou přehledně zobrazeny na **Obr.31**. Tyto změny byly identifikovány pomocí hmotové spektrometrie MALDI-TOF (**Tab.8**).

Při použití „depleční“ kolony a fluorescenčního barvení došlo k nárůstu detegovatelných proteinů na gelech vzhledem k celkovému proteomu a to na 400 bílkovinných skvrn.

OBR. 30.: „Depletovaný“ proteom lidské kostní plazmy – kontrola a nemocní



Reprezentativní proteomy „depletované“ lidské kostní plazmy (zbavené 12 vysoce zastoupených bílkovin) s vyznačenými změnami v bílkovinné syntéze mezi vzorkem nemocných s ALL (**B**) a kontrolní skupinou (**A**), jedná se vždy o směsný vzorek z 5 jedinců. Zobrazeny jsou 2 nezávislé série „deplecí“. Čísla *spotů* odpovídají dané počítačové analýze a nejdou shodná s **Obr.31**. Barevně jsou označeny změny: unikátní proteiny (žlutě a oranžově), zvýšená syntéza (4x, červeně), zvýšená syntéza (2x, zeleně). Na každý gel bylo naneseno 200 µg proteinů. Pro separaci byly použity IPG *stripy* s pH gradientem v rozmezí pH 3-10 a 12,5% SDS-PAGE gely, proteiny byly na gelu detegovány fluorescenční barvou SYPRO Ruby.

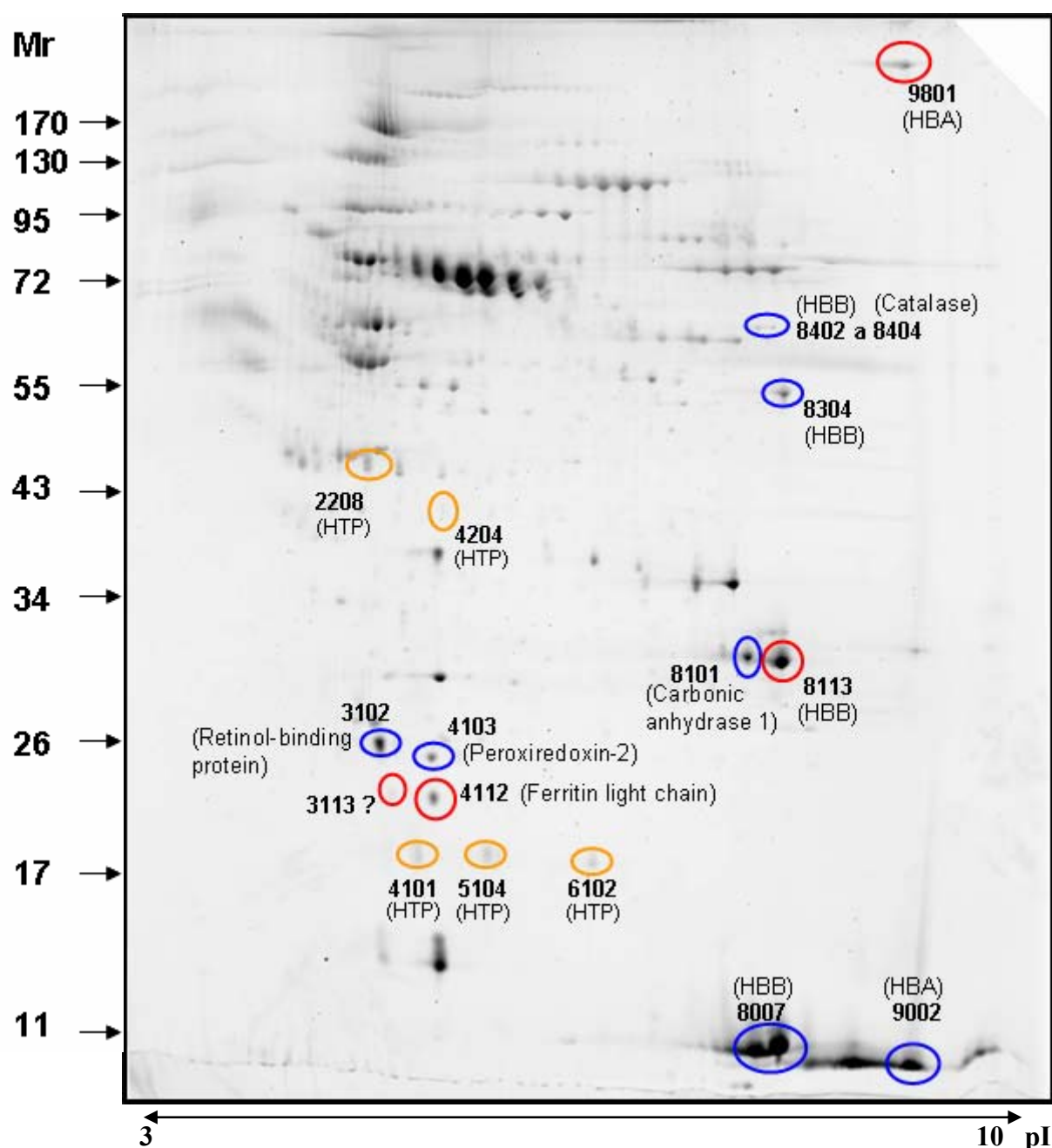
Pro první sérii pokusů byly připraveny směsné vzorky 5 nemocných dětí a 5 kontrol. Pomocí počítačové analýzy bylo zjištěno, že 1 protein je jedinečný pro kontrolní skupinu (SSP 3113), dále 6 proteinů bylo 4násobně a více zvýšeno v kontrole (faktor 4x) a u dalších 11 proteinů byla syntéza minimálně 2x zvýšená/snížená a to s pravděpodobností 98 % (**Obr.30**).

V druhé sérii experimentů, která probíhala za identických podmínek jako první, byla snaha definovat variabilitu námi nastaveného systému směsných vzorků. Opět byly připraveny směsi 5 nemocných s diagnostikovanou ALL s různým genetickým profilem a směs 5 kontrolních vzorků od pacientů v remisi. Výsledky počítačové analýzy byly: 1 unikátní protein v kontrole, nicméně jiný než v předešlé sérii, a 6 unikátních proteinů u nemocných. Dále byla zjištěna 4x vyšší koncentrace 7 proteinů také u nemocných a při nižším limitu detekce (pouze 2x) jde o 24 bílkovin, z toho 5 je zvýšených v kontrole s pravděpodobností 98% (**Obr.30**).

Porovnání obou sérií pokusů ukázalo, že 5 proteinových změn je společných pro obě série pokusů a to i vzhledem ke zvýšení jejich koncentrace. Jedná se o proteiny SSP 4112 (ferritin), 9002 (hemoglobin alfa), 8402 (hemoglobin beta), 8404 (kataláza), 8101 (CO₂ anhydráza 1). Dále byly do identifikace zařazeny bílkovinné změny, které byly zjištěny v jednotlivých sériích. Pro první sérii to byly proteiny SSP 3113, 8007, 8113, 8304, 2208 a pro sérii druhou se jednalo o proteiny SSP 4101, 5104, 6102, 4204, 9801, 3102, 4103 (**Obr.31 a 32, Tab.7 a 8**).

Rozdíly mezi první a druhou sérií lze vysvětlit nejen rozdílností vzorků, která je značná (směsi jiných nemocných a kontrol), ale i kapacitou kolonky. Výsledky naznačují, že významně zvýšená koncentrace proteinů SSP 3106, 5102 a 6103, které se vyskytují v oblasti 42 tis. a byly identifikovány jako haptoglobin, může být právě způsobena nedostatečným vychytáním této bílkoviny „imunodepleční“ kolonou. Navíc byly změny i v oblasti imunoglobulinu, který měl být také víceméně vychytán, což by podporovalo teorii nerovnoměrného zachytu majoritních bílkovin kolonkami (**Obr.30, II. série**).

OBR. 31.: Proteom „depletovaný“ frakce kostní plazmy s vyznačenými změnami v syntéze bílkovin mezi vzorkem nemocných a kontrolou



„Depletovaný“ proteom lidské kostní plazmy (po odstranění 12 vysoce zastoupených bílkovin) s vyznačenými změnami v proteinovém profilu mezi vzorkem nemocných a kontrolou. Na gel bylo naneseno 200 µg proteinů. Separace probíhala v IPG *stripech* s pH gradientem v rozmezí pH 3-10 (zobrazeno v dolní části obrázku), standardy molekulových hmotností (v tis.) jsou zobrazeny v levé části obrázku. Bílkoviny byly detegovány fluorescenční barvou SYPRO Ruby. Označené proteinové skvrny byly identifikovány hmotovou spektrometrií MALDI-TOF a jsou uvedeny v **Tab.8**.

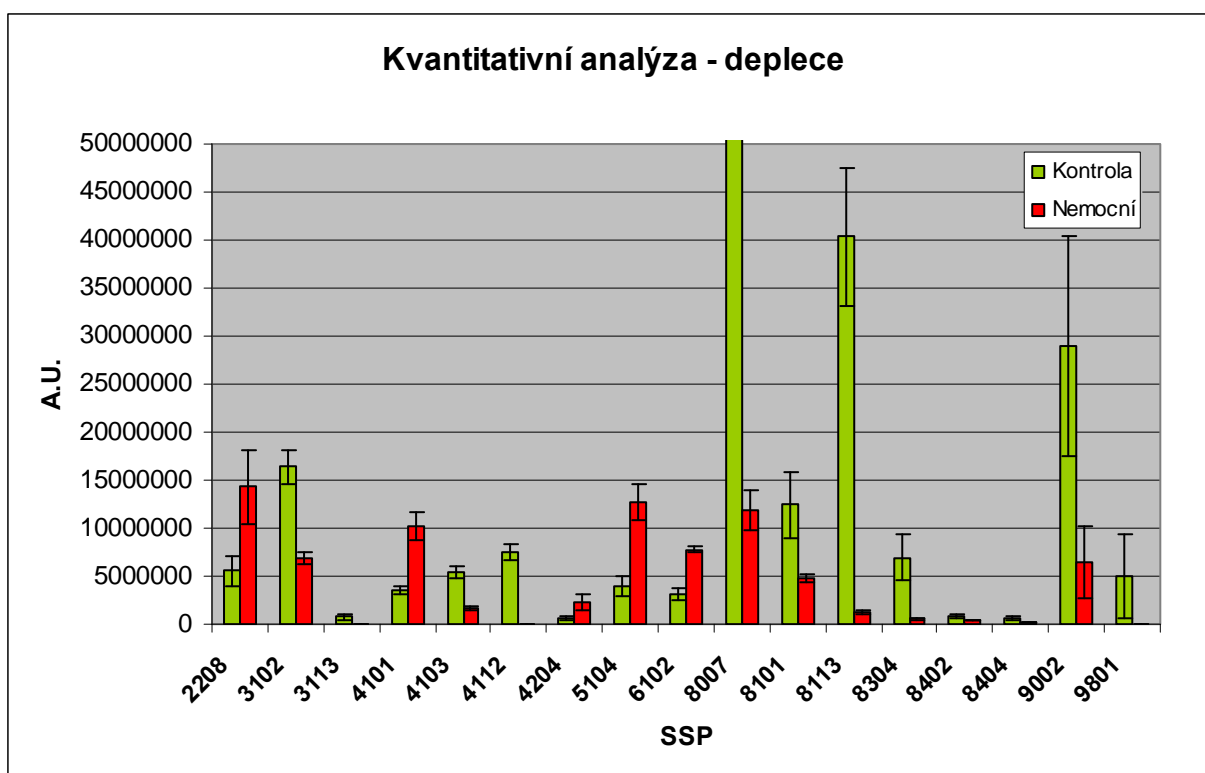
Barevně jsou zvýrazněny *spoty*, u nichž jsou rozdíly v kvantitě mezi proteomy – červeně (proteiny identifikovány jen u kontroly), modře (proteiny zvýšeny v kontrole), oranžově (proteiny zvýšeny u nemocných). Grafické vynesení viz **Obr.32**.

TAB.7.: Kvantitativní analýza depletovaného proteinového profilu kostní plazmy

	Kontrola		Nemocní	
SSP (číslo spotu)	A.U. (intenzita)	Směrodatná odchylka	A.U. (intenzita)	Směrodatná odchylka
2208	5533599	1524092	14340475	3845185
3102	16379645	1743183	6864646	641345
3113	739246	296927	0	0
4101	3582280	438834	10189826	1475746
4103	5396823	622253	1649628	203309
4112	7476965	836319	0	0
4204	615788	197367	2297955	780844
5104	3911544	1001055	12644907	1840727
6102	3188680	626071	7807795	309198
8007	129876186	35245451	11930463	2115721
8101	12478601	3424809	4773402	426195
8113	40327171	7175962	1171805	202177
8304	6917961	2391183	579219	64852
8402	829689	123454	342384	14200
8404	671449	153042	241492	31197
9002	28959314	11411082	6380180	3774354
9801	4967761	4366633	0	0

Tabulka shrnuje změny v bílkovinném spektru mezi vzorkem nemocných a kontrolou. V tabulce je uvedeno číslo proteinu (SSP) společně s průměrnou intenzitou *spotu* ze 4 nezávislých gelů. Barevně jsou zvýrazněny *spoty*, u nichž jsou rozdíly v kvantitě mezi proteomy – modré jsou proteiny, jejichž intenzita je minimálně 4x vyšší či nižší (faktor 4x), žlutě zvýrazněný protein je unikátní (detegovaný pouze u kontroly). U nezvýrazněných proteinů je syntéza zvýšena/snížena 2x. Pro přehlednost jsou data vynesena do grafu (viz Obr.32).

OBR. 32.: Grafické znázornění intenzity vybraných proteinů kostní plazmy



TAB.8.: Identifikace vybraných proteinů kostní plazmy pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

číslo spotu (SSP)	Název proteinu	Označení proteinu	„Protein Score“	Mr (tis.)	pI
2208*	Haptoglobin	HPT	517	46	6,1
3102	Retinol-binding protein 4	RET4	283	23	5,8
3113	neidentifikován				
4101*	Haptoglobin	HPT	168	46	6,1
	Ceruloplasmin	CERU	161	123	5,4
4103	Peroxiredoxin-2	PRDX2	688	22	5,7
4112	Ferritin light chain	FRIL	521	20	5,5
4204A*	Haptoglobin	HPT	285	46	6,1
4204B*	Haptoglobin	HPT	400	46	6,1
5104*	Haptoglobin	HPT	553	46	6,1
6102*	Haptoglobin	HPT	478	46	6,1
8007	Hemoglobin subunit beta	HBB	715	16	6,8
8101	Carbonic anhydrase 1	CAH1	927	29	6,6
8113	Hemoglobin subunit beta	HBB	718	16	6,8
8304	Hemoglobin subunit beta	HBB	711	16	6,8
8402	Hemoglobin subunit beta	HBB	570	16	6,8
8404	Catalase	CATA	119	60	6,9
9002	Hemoglobin subunit alpha	HBA	520	15	8,7
9801	Hemoglobin subunit alpha	HBA	357	15	8,7

Tabulka uvádí identifikované proteiny *Homo sapiens* - jejich název, označení, „protein score“ (ukazatel spolehlivosti měření), teoretické hladiny Mr (v tis.) a izoelektrický bod (pI). Žlutě zvýrazněné proteiny mají nízké „protein score“, proteiny označené hvězdičkou jsou zvýšeny u vzorků nemocných. V tabulce jsou uvedeny proteiny z kvantitativní analýzy (Obr.31 a Tab.7). Protein SSP 3113 se nepodařilo identifikovat pro malé množství vzorku.

Hlavním cílem této části práce bylo pomocí standardizované metody 2-DE zachytit kandidáty na *biomarkery* onemocnění ALL u dětských pacientů.

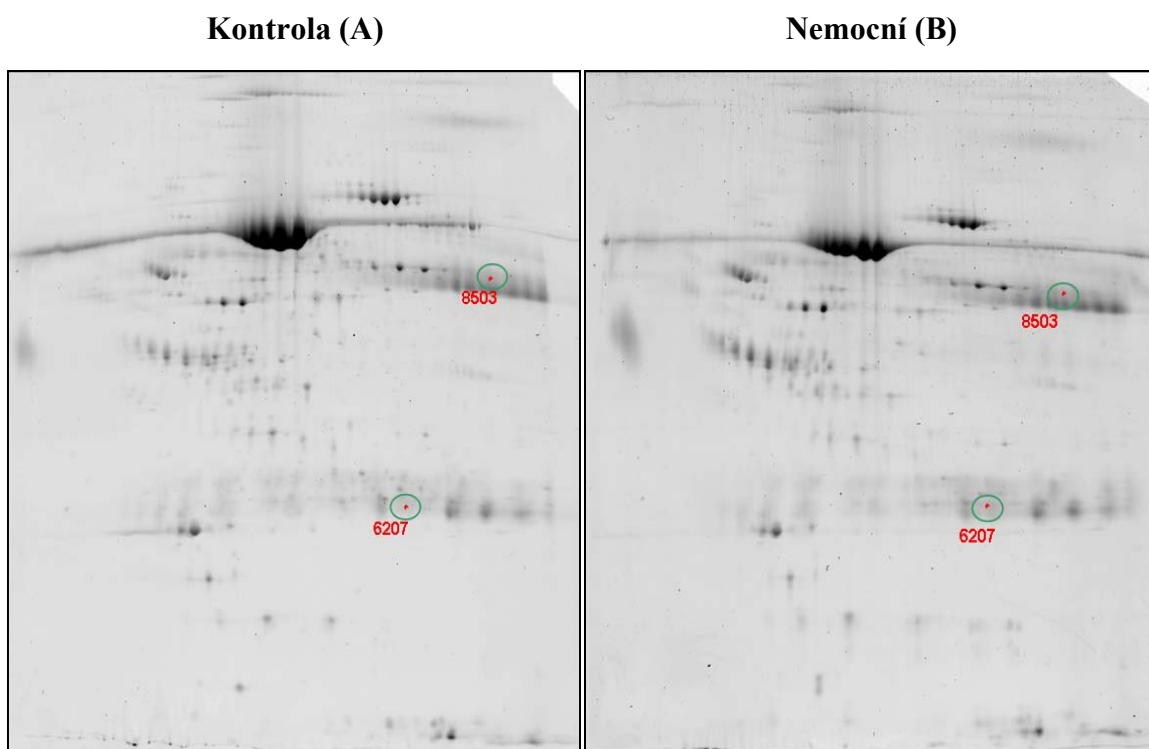
Ukázalo se, že pomocí „deplečního“ kroku, došlo k navýšení množství bílkovin na gelu a tak byla podpořena vizualizace i minoritně zastoupených bílkovin.

Výsledek komplexní analýzy poukázal na změny ve sledovaných proteomech pacientů a kontrol. Tyto primární data poslouží jako jedna z dílčích částí pro celkovou interpretaci problému „proteinů důležitých u dětské ALL“.

5.3.1.3. Kostní plazma – albuminová frakce (albumin a dalších 11 abundančních bílkovin)

Poslední částí separovaného vzorku, byla albuminová frakce kostní plazmy, která zůstala navázána na „imunodepleční“ kolonku. I tato frakce byla podrobena 2-DE a analyzována. Reprezentativní proteomy s vyznačenou analýzou jsou na **Obr.33**.

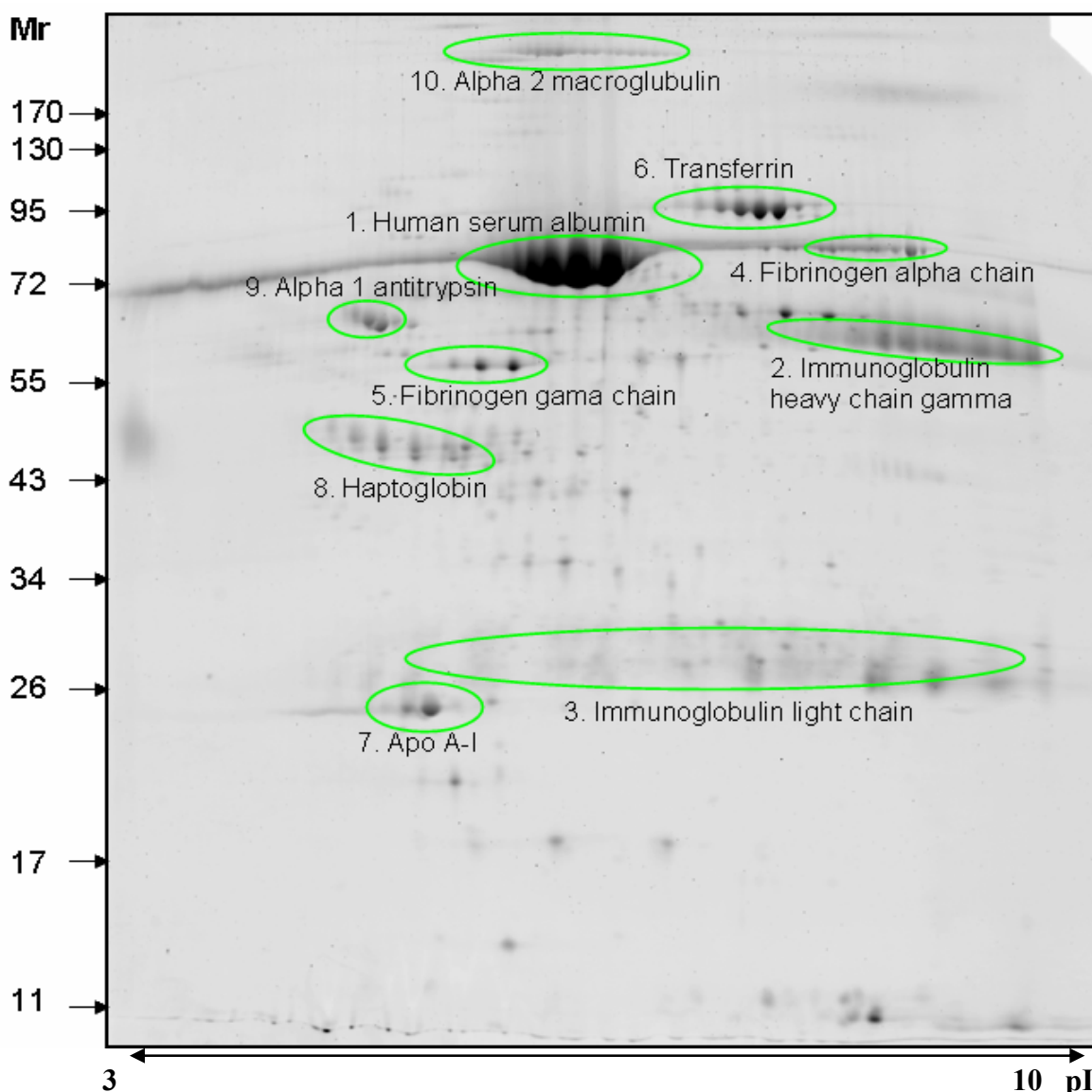
OBR. 33.: Albuminová frakce lidské kostní plazmy – kontrola a nemocní



Reprezentativní proteom albuminové frakce lidské kostní plazmy (frakce 12 vysoce zastoupených bílkovin kostní dřeně + další bílkoviny nachytané na „imunodepleční“ koloně) – vzorek nemocných **(B)** (směs 5 pacientů s diagnostikovaným maligním onemocněním) a kontrolní vzorek **(A)** (směs 5 pacientů po úspěšné transplantaci kostní dřeně). Na gel bylo naneseno 200 µg proteinů. Pro separaci byly použity IPG *stripy* s pH gradientem v rozmezí pH 3-10 a 10% SDS-PAGE gely, proteiny byly na gelu detegovány fluorescenční barvou SYPRO Ruby. Na gelech jsou vyznačeny rozdíly v proteinovém spektru kontrola versus nemocní (SSP 6207 a 8503).

Tento krok separace albuminové frakce byl zařazen z důvodu hledání nějaké specifické bílkoviny jedinečné pro nemocné s ALL či kontrolní vzorek, která by mohla být pevně navázána na albuminovou frakci. Analýza albuminové frakce ukázala 2 významné změny u proteinů SSP 6207 a 8503. V obou případech se nicméně jednalo o proteiny, které jsou součástí imunoglobulinové frakce, jeho lehkého i těžkého řetězce.

OBR. 34.: Proteom albuminové frakce kostní plazmy s vyznačenými 12 majoritními bílkovinami



Reprezentativní proteom albuminové frakce lidské kostní plazmy s vyznačenými 12 vysoce zastoupenými bílkovinami) Na gel bylo naneseno 200 µg proteinů. Separace probíhala v IPG *stripech* s pH gradientem v rozmezí pH 3-10 (zobrazeno v dolní části obrázku), standardy molekulových hmotností (v tis.) jsou zobrazeny v levé části obrázku. Bílkoviny byly detegovány fluorescenční barvou SYPRO Ruby. Barevně jsou zvýrazněny majoritní bílkoviny, jedná se o **1.** lidský sérový albumin, **2.** imunoglobulin těžký řetězec (gama), **3.** imunoglobulin lehký řetězec, **4.** fibrinogen, **5.** fibrinogen (gama řetězec), **6.** transferin, **7.** Apo A-I, **8.** haptoglobin, **9.** antitrypsin (alfa 1), **10.** makroglobulin (alfa 2).

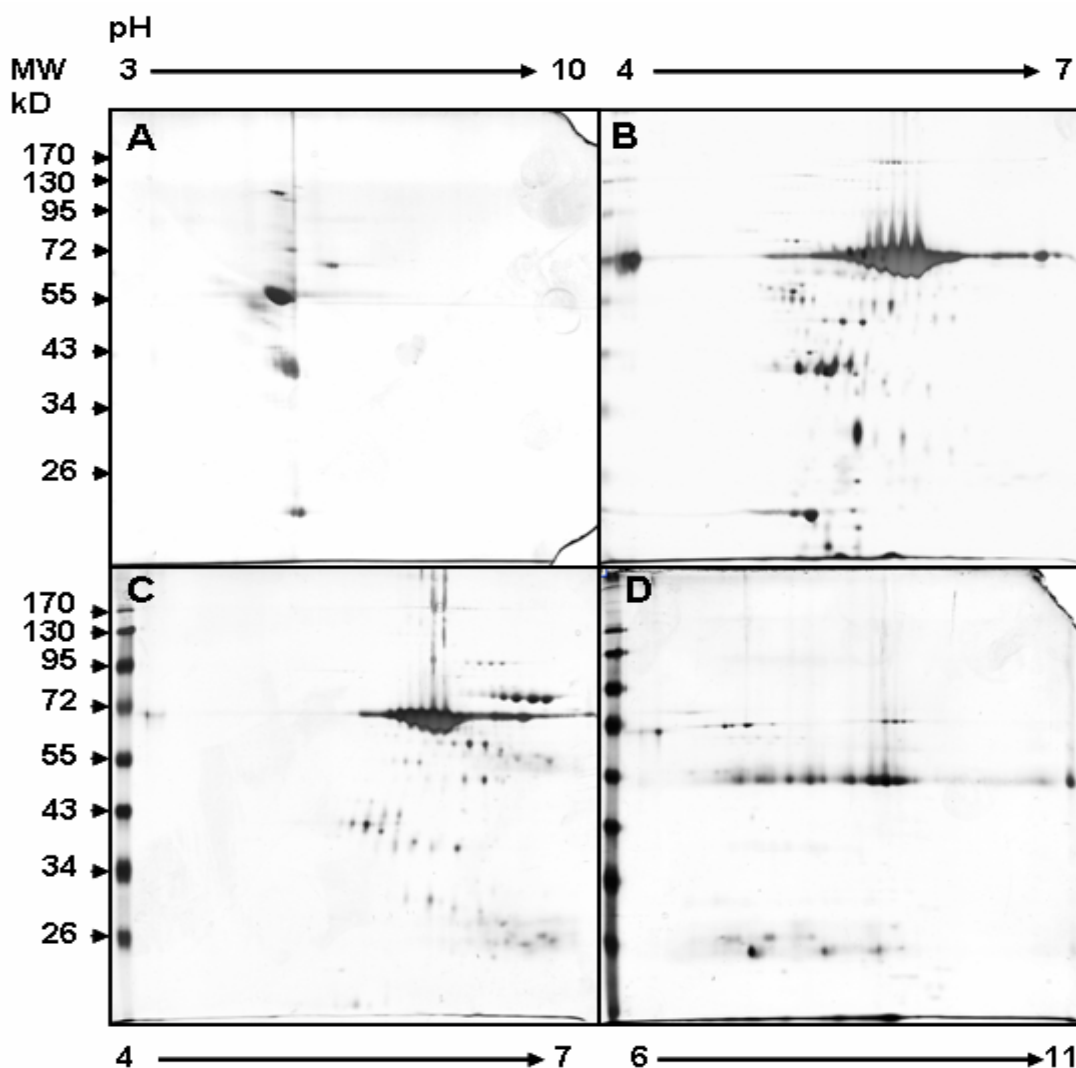
Celkový obraz vychytaných majoritních bílkovin je na **Obr.34.**

Závěrem lze shrnout, že na naší úrovni detekce nebyl objeven žádný protein, který by byl navázán na albumin či jiný majoritní protein a jehož syntéza by souvisela s onemocněním ALL.

5.3.2. „Pre-frakcionace“

Další způsob jak snížit komplexitu vzorku byla „pre-frakcionace“ založená na principu negelové izoelektrické fokusace kapalného vzorku. K tomuto účelu byl vybrán frakcionační přístroj „**ZOOM®** IEF Frakcionator“ od firmy Invitrogen (Carlsbad, Kalifornie), více viz **Kap.2.5.2.3. a Kap.4.6.3.2.**

OBR. 35.: „Pre-frakcionace“ vzorků kostní plazmy – 4 dílčí frakce



Proteom 4 dílčích frakcí lidské kostní plazmy – (A) frakce pH 3,0-5,4, (B) frakce pH 5,4-6,2, (C) frakce pH 6,2-7,0 a (D) frakce pH 7,0-10,0. Na gel bylo naneseno 590 µg proteinů (naměřené množství proteinů před frakcionací, beze ztrát). Pro separaci byly použity IPG *stripy* s pH gradientem ve vhodném rozmezí pH, tedy pro (A) 3-10, (B) 4-7, (C) 4-7 a (D) 6-11 (rozsah pH je zobrazen nad, resp. pod obrázkem). 10% SDS-PAGE gely byly barveny stříbrem. Standardy molekulových hmotností (v tis.) jsou zobrazeny v levé části obrázku.

Proteinová směs byla rozdělena do frakcí, které byly v rozmezí 1 až 3 jednotek pH. Jednalo se o frakce pH 3,0-5,4, pH 5,4-6,2, pH 6,2-7,0 a pH 7,0-10,0. Separované frakce byly dále děleny dle standardního postupu pro 2-DE, tedy první rozměr – IEF, vybrán *strip* o vhodném rozmezí pH a druhý rozměr – SDS PAGE (10 % gel). Výsledné proteomy byly barvené stříbrem (**Obr.35**).

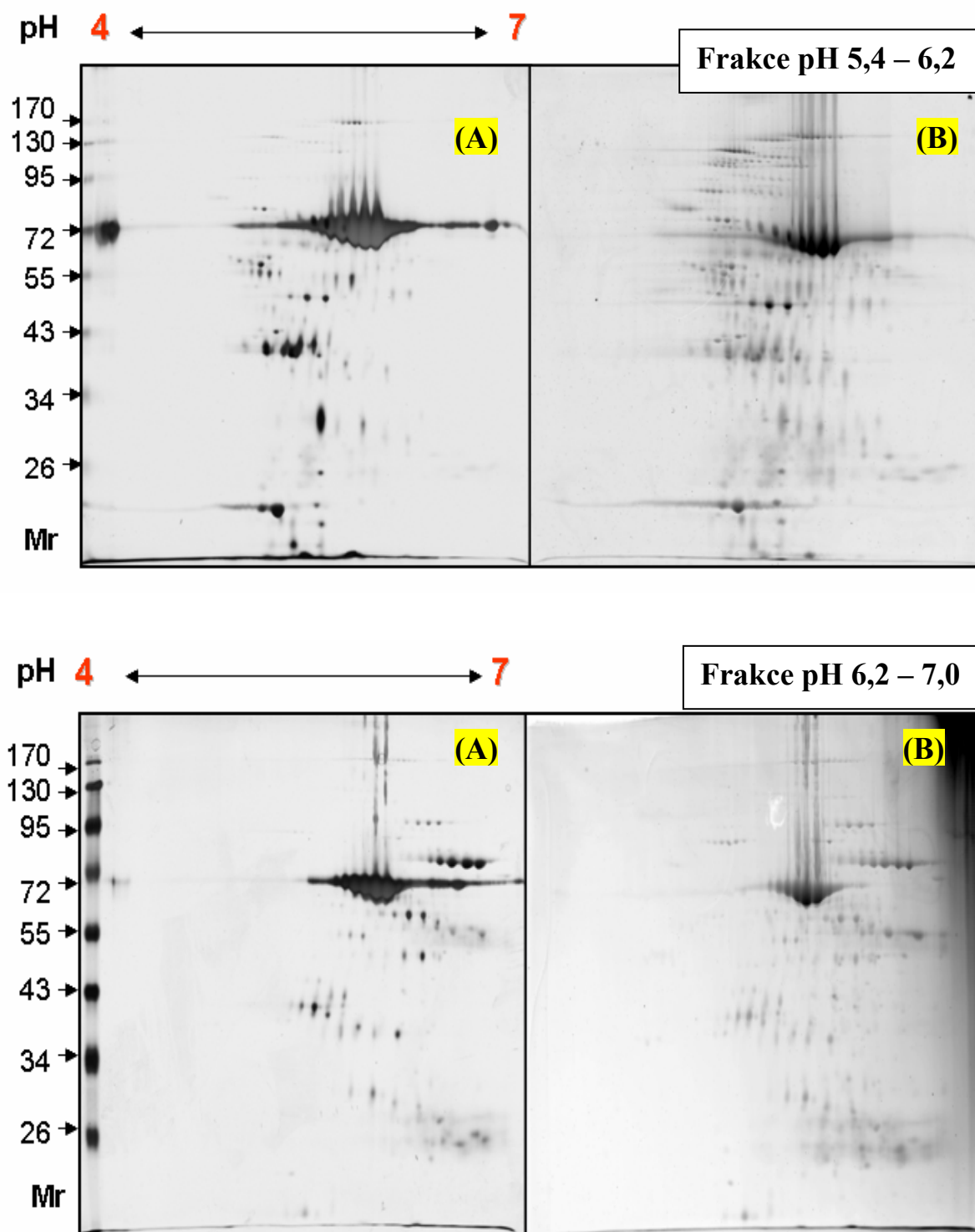
Při porovnání gelů bylo zřejmé, že frakcionace proběhla úspěšně a na gelech nebyly zaznamenány významnější kontaminace ze sousedních frakcí. Majoritní sérový albumin byl detegován ve dvou frakcích o pH 5,4-6,2 a 6,2-7,0, což vzhledem k jeho množství a charakteristice (M_r kolem 68 000 a pI v rozsahu 5,5 - 6,1) bylo v souladu s očekáváním. Ve frakci pH 3,0-5,4 bylo velmi málo detegovaných proteinů a ve frakci pH 7,0-10,0 byly nalezeny bazické proteiny, u nichž separace nebyla dostatečná. Celkové množství proteinů na gelech bylo nízké, což byl zřejmě důsledek předchozího kroku frakcionace, kdy došlo k významnému naředění vzorku. Pro další experimenty bylo proto přistoupeno k citlivějšímu barvení pomocí fluorescenční barvy SYPRO Ruby.

Reprezentativní proteomy frakcí pH 5,4-6,2 a 6,2-7,0, které byly v centru naší pozornosti, jsou zobrazeny na **Obr.36**. Zbývající dvě frakce byly z dalších analýz vyloučeny vzhledem k tomu, že kyselá frakce (pH 3,0-5,4) obsahovala pouze minimum bílkovin bez znatelného rozdílu a naopak bazická frakce (pH 7,0-10,0) byla špatně separovaná a vyžadovala by speciální přístup pro další analýzy.

Z výsledku je patrné, že citlivost fluorescenčního barvení je vysoká a významně zvyšuje počet detegovatelných bílkovin.

Přes toto zdokonalení se nám nicméně nepodařilo dostatečně zvýšit počet detegovatelných bílkovin na gelu. Ztráty způsobené během frakcionace, při které došlo k 10násobnému naředění vzorku, nebyly kompenzovány ani opětovným vysrážením po proběhlé „pre-frakcionaci“. Proto bylo od tohoto typu separace bílkovin upuštěno, jako od nevhodné metody pro náš preparát a naše požadavky. Nic to nemění na skutečnosti, že se jedná o zajímavou metodu a využitelnou pro jiné účely či cíle.

OBR. 36.: Úroveň detekčního limitu pro 2 typy barvení (stříbro a SYPRO Ruby) u frakcí pH 5,4-6,2 a pH 6,2-7,0



Proteomy frakcí lidské kostní plazmy – frakce pH 5,4-6,2 a frakce pH 6,2-7,0 Na gel bylo naneseno 590 μg proteinů (naměřené množství proteinů před frakcionací, beze ztrát). Pro separaci byly použity IPG *stripy* v rozmezí pH 4-7 (rozsah pH zobrazen nad obrázkem). 10% SDS-PAGE gely byly barveny stříbrem (A) a SYPRO Ruby (B). Standardy molekulových hmotností (Mr, v tis.) jsou zobrazeny v levé části obrázku, rozsah pI je zobrazen nad obrázkem.

6. DISKUZE

Předkládaná dizertační práce se zaměřila na využití gelově-separačních technik ve třech nezávislých vědeckých studiích. Při řešení daných úkolů bylo potřeba separační techniky modifikovat a přizpůsobit tak vytyčeným cílům. Jednotlivé projekty budou pro větší přehlednost diskutovány v oddělených kapitolách.

6.1. Studium bakteriální membrány *B. subtilis* dlouhodobě vystaveného pH stresu

Tato část práce se zabývala vlivem pH prostředí na vlastnosti cytoplazmatické membrány *B. subtilis*, s důrazem na její bílkovinnou část. Přestože stresová odpověď bakterie na změny vnějšího prostředí byla již dříve rozpracována (Petráčková 2001 a 2003), hlavním přínosem této práce byla aplikace metodiky 2-DE na bakteriální membránové preparáty.

Problém se separací membránových proteinů pomocí 2-D elektroforézy je všeobecně znám, zvláště dělení proteinů bazických a hydrofobních a proteinů obsahujících více než 3 transmembránové domény (McDonough a Marban 2005) je poměrně obtížné. Byly vypracovány určité postupy, které zvyšují možnosti separace membránových bílkovin, jako je využití různých detergentů, denaturačních činidel či thiol-obsahujících činidel (Luche *et al.* 2003, Musante *et al.* 1998), ty ale nedosahují vysoké reproducibility, nebo při jejich použití dochází ke kontaminaci i jinými frakcemi bílkovin. V této práci byl díky modifikaci srážecích technik (srážení pomocí kyseliny trichloroctové v kombinaci s acetonem) a významnému prodloužení doby solubilizace vzorku ve vzorkovém pufru II (navíc s obsahem thiomočoviny), získán separovatelný vzorek membránových bílkovin *B. subtilis*. Navíc vysoká reprodukovatelnost proteinové extrakce umožnila přípravu standardních vzorků odpovídajících fyziologickým parametrům experimentu. Nicméně vzhledem k typu izolační metody je třeba uvést, že se jedná o celkovou membránovou frakci bílkovin *B. subtilis*, tj. membránové proteiny a bílkoviny s membránou asociované.

K experimentům byl použit kmen *Bacillus subtilis* 168 trp₂-. Přestože se tato bakterie v prostředí běžně setkává s velkými změnami pH, nejsou dosud informace o jeho vlivu na fyziologii bakterie dostatečné (Wiegert *et al.* 2001 a Cao *et al.* 2002,

Padan *et al.* 2005, Wilks *et al.* 2009) a některé i nepřesné při definici vztahu mezi pH a organickými kyselinami (Chen *et al.* 2009, Van Duy *et al.* 2007). Toto bylo důvodem pro bližší zkoumání této stresové odpovědi. V literatuře je v souvislosti s kyselým pH mnoho pojednáváno o enterobakteriích (*Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* (Foster 1999, 2000, Richard a Foster 2007, Abdelwaheb a Ahmed 2009), či o potravinářsky zajímavějších kmenech rodu *Bacillus* (*B. cereus*) (Thomassin *et al.* 2006).

Tato práce byla převážně zaměřena na dlouhodobou adaptaci bakterie *Bacillus subtilis* na pH stres a to, jak na změny v proteomu cytoplasmatické membrány bakterie, tak na membránu jako celek studovanou pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie.

Podmínkou této studie bylo dokonalé zvládnutí kultivačních situací s reprodukovatelnou rychlostí růstu v pH 5,0 a pH 8,5, tedy plně reprodukovatelnou fyziologií stresových buněk. V kontrolních podmínkách (pH 7,0) se doba zdvojení bakterií pohybovala kolem 19 minut. Při kultivaci bakterií v mediu o pH 5,0 se doba zdvojení prodloužila o třetinu na 27 min a u media o pH 8,5 na 31 min (**Obr.9; Kap.5.1.1.**). Toto zpomalení růstu odráží fyziologický stav bakterie, která se vyrovnává s nepříznivou změnou vnějšího prostředí.

Izolovaná membránová frakce dlouhodobě adaptovaných bakterií na kyselé pH byla separována pomocí 2-D elektroforézy. Změny ve spektru bílkovin byly nezávisle detegovány dvojím způsobem - radioaktivním značením pomocí izotopu [³⁵S]-metioninu a barveny stříbrem. Získané proteomy membránových frakcí z pH 5,0 a kontroly ukázaly kvalitativní i kvantitativní změny celkově u 25 proteinů. Statisticky významné změny byly zjištěny u 5 z nich (**Obr.10 a 11; Kap.5.1.2.**). Jedná se o proteiny AcoB, YkwC, SodA, YjcH a YwaC, které byly následně identifikovány pomocí MALDI-TOF.

Identifikovaný **AcoB** protein (zvýšená syntéza 9krát) je beta podjednotkou thiamindifosfát dependentní acetoin dehydrogenázy (E1 komponenta). Tento enzym hraje roli v mnoha metabolických drahách, např. v glykolýze, glykoneogenezi, v biosyntéze valinu, leucinu a izoleucinu a v metabolismu pyruvátu. Acetoin, jako důležitý katabolický produkt bakterie, je neutrální a tím dovoluje bakterii degradovat velké množství glukózy bez doprovodné acidifikace média během exponenciálního růstu (Grundy *et al.* 1993). Acetoin slouží také jako zásobní zdroj uhlíku, který je sekretován do média a je možné jej opět importovat zpět do buňky; to může být jedním

z důvodů jeho vysoké produkce při pH stresu. Práce Wilkse *et al.* 2009 ve srovnávací studii transkriptomů *B. subtilis* z pH 6, pH 7 a pH 9 ukázala zvýšenou produkci acetoinu a extracytoplazmatického stresového regulonu SigX v závislosti na acidifikaci média.

Další identifikovaný protein, jehož syntéza se po stresu 6krát zvyšuje, je **SodA** (Mn^{2+} dependentní superoxid dismutáza), která je syntetizována během vegetativního růstu a sporulace (Inaoka *et al.* 1999), má oxidoreduktázovou aktivitu a je schopna ničit volné radikály vznikající v buňce. SodA, jako stresový protein, je indukován při tepelném, oxidativním stresu, při zvýšené koncentraci solí, při limitaci glukózou či kyslíkem (Periago *et al.* 2002, Inaoka *et al.* 1998) a je na něj upřena oprávněná pozornost (Areekit *et al.* 2011). Přestože SodA je uváděn jako solubilní cytoplazmatický protein, byl identifikován jako extracelulární protein v práci Hirose *et al.* (2000) a proto naše identifikace tohoto proteinu v membránové frakci bílkovin je možná. V případě SodA byla jeho detekce možná pouze na stříbrem barvených gelech, protože obsah metioninu v proteinu je velmi nízký (Gerner *et al.* 2002), přesto změny na všech porovnávaných gelech byly významné.

Šestinásobně zvýšená syntéza byla pozorována u proteinu **YwaC**, který je považován za suspektní GTP-pyrofosfokinázu hrající úlohu v metabolismu nukleotidů a nukleových kyselin a jeho exprese je pod kontrolou sigma W regulonu (Cao *et al.* 2002). Zvýšená syntéza po stresu byla i u proteinů YkwC (2x) a YjcH (6x). **YkwC** je 3-hydroxyizobutyryát dehydrogenáza (oxidace 3-hydroxybutyrátu na metylmalonát) a zřejmě obsahuje transmembránové domény. **YjcH** je hypotetický protein s neznámou funkcí a s nejméně jednou transmembránovou doménou. U *E. coli* byl tento protein objeven v proteomu vnitřní membrány (Daley *et al.* 2005).

Proteiny YwaC a YjcH byly zjištěny i v proteomové studii etanolového stresu, proto se zdá, že by mohlo jít o obecné stresové faktory bakterie *B. subtilis* (Petráčková, Šemberová *et al.* 2010).

Proteomická studie ukázala, že při vystavení bakterie *B. subtilis* dlouhodobému pH stresu se indukují obecné i specifické stresové bílkoviny. Získané výsledky z 2-DE membránové frakce *B. subtilis* také ukázaly, že membrána bakterie po stresu prochází částečnou rekonstrukcí proteinové frakce. Proto se nabízela otázka, zda jsou tyto změny doprovázeny i změnami v celkové struktuře membrány. Studie bílkovinných změn byla proto doplněna sledováním mikroviskozity membrány *B. subtilis* vystaveného dlouhodobému pH stresu.

Analýzu struktury i dynamiky cytoplasmatické membrány poskytla metoda pulzní časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Informace obsažená v parametru rovnovážné anizotropie fluorescence (r_{ss}) závisí na době života excitovaného stavu τ a rotační rychlosti R sondy lokalizované v membráně. Proto byla pomocí této metody měřena doba života excitovaného stavu sondy DPH (τ) v membránových vzorcích bakterií kultivovaných dlouhodobě při daném pH, z ní byla vypočítaná střední doba života excitovaného stavu (τ_{mean}) (**Obr.13; Kap.5.1.3.**). Z výsledků vyplynulo, že se zvyšujícím se pH dochází k zvýšení hodnoty τ_{mean} . Nejkratší doba života excitovaného stavu sondy byla zjištěna pro kyselé pH. Prodlužování doby života sondy bývá obvykle interpretováno ve smyslu zvýšení polarizace a většího rozvolnění prostředí, které sonda monitoruje, což se ukazuje v alkalickém pH. Naproti tomu vliv pH prostředí (roztoku) na hodnoty τ_{mean} je zanedbatelný zvláště u kontroly a pH 5,0.

Podobné výsledky přineslo i stanovení parametru uspořádanosti $\langle P2 \rangle$, který charakterizuje uspořádanost membrány. Mezními hodnotami pro parametr $\langle P2 \rangle$ je hodnota $\langle P2 \rangle = 1$, kdy je membrána zcela uspořádána a pohyb sondy DPH je značně omezen, a hodnota parametru $\langle P2 \rangle = 0$, kdy je naopak membrána neuspořádána a pohyb sondy je volný. Výsledky ukazují, že membrána z kultivace při pH 5,0 je nejuspořádanější a se zvyšující se hodnotou pH uspořádanost klesá (**Obr.14; Kap. 5.1.3.**). Uspořádanost membrány tedy zřejmě hraje významnou roli v modulaci propustnosti membrány pro protony a schopnosti buňky udržovat stále intracelulární pH bez ohledu na rozsáhlou variabilitu vnějších podmínek.

Z výsledků jasně vyplývá, že v membránách buněk kultivovaných při pH 5,0 je pohyb sondy DPH omezený - struktura je rigidnější. Naproti tomu při pH 8,5 je uspořádanost membrány menší a membrána je „tekutější“. Tyto výsledky podpořila i dřívější analýza složení mastných kyselin v membráně, kde dlouhodobá kultivace při kyselém pH měla velký vliv na rigidizaci membrány bakterie (Petráčková 2003, Petráčková, Večeř *et al.* 2010)

Závěrem lze konstatovat, že pH stres indukuje v cytoplasmatické membráně bakterie výraznou adaptivní odpověď. Dlouhodobá adaptace vyvolává změny nejen ve spektru membránových proteinů, ale i ve fyzikálně-chemické kompozici membrány, což bylo potvrzeno metodou časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Tyto změny se promítají do strukturních i dynamických parametrů membrány. Je tedy nepochybné, že

vzájemné ovlivňování i souhra bílkovinné a lipidové složky membrány vedou k úspěšnému překonání stresové situace.

6.2. Proteomová analýza populace k antibiotiku rezistentních bakterií *E. coli* během růstu v kontinuálním kultivačním systému

Další dílčí část práce byla zaměřena na identifikaci proteinových změn v proteomech k antibiotiku rezistentních bakteriálních populací *E. coli*, které vznikají při dlouhodobých kultivacích v přítomnosti *subletálních* koncentrací antibiotik.

K těmto studiím byla použita mutanta obvyklého kmene *E. coli* K12. Šlo o mutace, které zaručovaly její rezistenci a zároveň možnost kontroly některých parametrů růstu. Mutace v *envA* genu napomáhala snazšímu vstupu antibiotika do buňky, zároveň však souvisela s horším dělením buňky, bakterie má tendenci tvořit řetízky (Nomark 1969). Nicméně v našem kultivačním systému nebyla tvorba řetízků pozorována. Další mutace v ribozomálním proteinu L4 vedla ke ztížené vazbě erytromycinu k ribozómu a tím k rezistenci bakterie. Tato mutace byla zvolena kvůli možnosti sledovat vývoj rezistence k antibiotiku v populaci, která roste dlouhodobě pod selekčním tlakem antibiotika, což je situace velmi nežádoucí a zároveň velmi častá v klinické praxi. Na plazmidu nesený gen pro luciferázu pak umožnil nepřímo stanovit přesnost translace jako důsledek *nonsense suprese* (translační chyby) terminačního kodónu v proximální části B genu luciferázy. Tato chyba vede k translaci funkční molekuly luciferázy a produkci světelného kvanta. Na stejném plazmidu byl nesen gen pro chloramfenikolovou rezistenci, který zaručoval, že v přítomnosti daného antibiotika, nedojde ke ztrátě tohoto plazmidu.

Sledování změn ve fyziologických parametrech v průběhu kontinuálního růstu bakterie poukazovalo na celkové změny, kterými v průběhu kontinuální kultivace populace *E. coli* prochází. Doba zdvojení se v kontrolním vzorku pohybovala kolem 60 minut. Podle očekávání, růst v přítomnosti antibiotika dobu zdvojení prodloužil na 80 minut, tedy o 30 %. Nicméně populace rostoucí v přítomnosti antibiotika ve 103. hod. růst výrazně zrychlila a doba zdvojení dosáhla 60 min, hodnoty velmi podobné kontrolní populaci ($T = 53$) min. (**Obr.16, Kap.5.2.1.**).

Dalším sledovaným parametrem byla přesnost translace. Relativní přesnost translace u kultivace s erytromycinem nejdříve stoupala do 43. hod, ale v populacích

ze 68. hod a 103. hod přesnost výrazně klesá, zatímco u kontrolní populace se proteiny ve 103. hod syntetizují s výrazně vyšší přesností.

Z proteomových kvantitativních dat získaných z radioaktivních gelů jsme vypočítali relativní množství syntetizovaného elongačního faktoru Tu v poměru ke všem syntetizovaným proteinům. Tato hodnota dává konkrétní informaci o efektivitě translačního systému a spolu s hodnotou přesnosti pak může být měřítkem fyziologické zdatnosti kultury. Vývoj hladiny relativní exprese EF-Tu do jisté míry kopíruje vývoj generační doby kultury se vzrůstem ve 43. a 68. hod a návratem na hodnotu odpovídající kontrole v populaci ze 103. hod. Jinými slovy v populaci ze 43. hod a 68. hod je potřeba téměř 1,5 až 2krát větší množství elongačního faktoru Tu pro syntézu stejného množství proteinů jako v kontrole nebo v populaci ze 103. hod. (**Obr.16, Kap.5.2.1.**).

Pomocí kontinuální kultivace *E. coli* v přítomnosti erytromycinu byly selektovány vysoce rezistentní klony, které s postupem času tvořily stále větší podíl v populaci, což ukázala jejich následná kultivace na pevných gradientových plotnách (**Obr.9, Kap.5.2.1.**).

Proteomová studie populace *E. coli* se tak jevila jako nezbytná součást fyziologických pozorování. Velkou výhodou bylo, že proteom *E. coli* je důkladně probádán (Westermeyer a Schickle 2009) a je excelentním modelem s řadou výhod, mezi něž patří např. menší složitost proteomu a velké množství publikovaných dat na internetu (databáze SWISS-PROT a NCBI). Přestože je proteom *E. coli* je dobře definován a optimalizován (Han a Lee 2006), výzkum nepolevuje a objevují se další novinky např. na úrovni membránového proteomu (Bernsel a Daley 2009), či komplexů (Pan *et al.* 2011).

Naše **srovnávací proteomová studie**, sledující vývoj rezistence u *E.coli*, ukázala výrazné změny v proteinových profilech erytromycinových a kontrolních populací během kontinuální kultivace. Výsledkem bylo celkově 61 odlišných proteinů, z toho pouze 4 proteiny se překrývaly v jednotlivých vzorcích (u všech sledovaných proteinů byla syntéza 4krát zvýšena, resp.snížena). U těchto bílkovin byl sledován i jejich vývoj v průběhu kultivace (**Obr. 24 a 25, Kap.5.2.2.**).

Následující identifikace vybraných bílkovin ukázaly, že ve 43. hod růstu, kdy se mění syntéza u 29 bílkovin, dochází k podstatnému zvýšení bazálního metabolismu u kultivace s erytromycinem, jedná se o zvýšenou syntézu bílkovin zabezpečujících

metabolismus cukrů (11 proteinů), aminokyselin (5 proteinů), nukleotidů (2 proteiny.). Tento vývoj nepochybně souvisí s nutnou potřebou energie na počátku kultivace s antibiotikem. Naopak 68. hod kultivace je „nejklidnějším“ obdobím, mění se syntéza pouze u 9 bílkovin podílejících se např. na pohybu bakterie či membránovém transportu. Ve 103. hodině dochází opět k nárůstu proteinových změn na 23 (**Tab.5, Kap.5.2.2**). Nicméně významně ubylo proteinů podílejících se na chodu bazálního metabolismu buňky, objevily se proteiny membránového transportu a signalizace, oxidoreduktázy, *chaperony* a proteiny podílející se na translaci (např. ribozomální bílkovina L12, která kooperuje s antibiotiky erytromycinem i chloramamfenikolem a u níž bylo zjištěno, že u *Streptomyces coelicolor* dochází k její fosforylaci (Mikulík *et al.* 2011).

Změny fyziologických parametrů populace *E. coli* rezistentní k erytromycinu vystavené dlouhodobému vlivu antibiotika spolu s daty proteomových analýz ukázaly, že takováto kultura je do značné míry tvořena klony s podstatně vyšší rezistencí k antibiotiku a zároveň se zvýšenou fyziologickou zdatností. Tedy kompenzuje náklady na zvýšení rezistence změnami v metabolismu, které ji dovolí účinně soutěžit se stejně zdatnými bakteriemi nehendikepovanými rezistenčními mutacemi. Proteomová data pak tyto změny potvrzují na úrovni změn exprese proteinů z odpovídajících oblastí metabolismu.

Výsledky počítačové analýzy a následné identifikace ukázaly, jak nesnadné je hodnotit změny v bakteriální populaci. Celkově lze napočítat šest desítek významných změn, jejichž cílená interpretace by vyžadovala další podpůrné experimenty a nebyla ani hlavním cílem této práce. Výsledek tak poukazuje na množství dat, které je schopna gelově-založená proteomika poskytnout, a na limity jejich následného zpracování. Nicméně výsledky tohoto projektu by měly upozornit na úskalí řešení problému rezistence k antibiotikům pouhým omezováním používání antibiotik s cílem umožnit větší rozšíření citlivých kmenů. Poukazují na důležitost správného dávkování antibiotik a na význam přesné diagnostiky původců infekčních onemocnění.

6.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie

Tato část práce byla zaměřena na proteomickou analýzu vzorků kostní plazmy dětí s diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Projekt byl

vypracováván společně s Klinikou dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol. Cílem této práce byla optimalizace metodiky separace a analýzy dodaných vzorků kostní plazmy pomocí 2-D elektroforézy.

Kostní plazma je bohatým zdrojem proteinů přímo z mikroprostředí kostní dřeně, a přestože se standardně nevyšetřuje, může poskytovat důležité informace o stavu pacienta. Cílem celého projektu bylo nalezení kandidátních proteinů jako *biomarkerů* ALL s použitím různých metod včetně srovnávací studie proteomů kostní plazmy od pacientů. Spolupráce s klinickým pracovištěm dovolila komplexní pohled na studované onemocnění z různých úhlů, který je zvláště při studiu rakovinného bujení nevyhnutelný (Iwade 2008).

Proteomický přístup dovozoval vytvoření kompletního proteinového profilu předloženého vzorku - zjištění a identifikaci všech nalezených rozdílů mezi nemocnými a kontrolní skupinou. Navíc, použití směsných preparátů umožnilo setřít individuální rozdíly mezi pacienty. Přes tyto výhody bylo ovšem nutné počítat s detekčním limitem 2-DE, která je schopna spolehlivě separovat bílkoviny větší než 10 kDa. Hledané *biomarkery* mohou mít i menší molekulovou hmotnost a tak bylo využití dalších metod ve spolupracující laboratoři zcela na místě (např. *proteinové array*).

Velký problém spojený se vzorkem kostní plazmy, který bylo třeba vyřešit, byl vysoký obsah majoritních bílkovin vyskytující se ve vzorku. Plazma obsahuje bohaté spektrum proteinů, které jsou zastoupeny v širokém rozsahu koncentrací (Anderson a Anderson 2002). Koncentrace některých těchto proteinů je ve srovnání s nejhojněji zastoupeným proteinem albuminem až o deset řádů nižší (Qian *et al.* 2006), což výrazně znesnadňuje analýzu.

Jak bylo ukázáno, přímá analýza celkového proteomu této složité směsi nevedla k získání informace o málo zastoupených složkách v plazmě (**Obr.28, Kap.5.3.1.1.**). Detekční schopnost nebyla dostatečná a bylo proto přistoupeno k rozdělení proteinů do „jednodušších“ frakcí pomocí dalších separačních technik. S použitím „depleční“ kolony s navázanými protilátkami proti 12 majoritním bílkovinám plazmy, systém „ProteomeLab IgY-12“ (firma Beckman Coulter), ve spojení s fluorescenčním barvením gelů, byl nejen významně snížen podíl majoritních bílkovin v gelu, ale navíc byl i zvýšen detekční limit o 35 % (**Obr.31, Kap.5.3.1.2.**).

Další překážkou při experimentu byla variabilita dodávaných vzorků. Přesto se podařilo najít 5 průnikových proteinů, které byly společné pro oba směsné vzorky od

různých pacientů. Další zjištěné rozdíly je možno přičíst zanášení a opotřebování „imunoafinitní“ kolonky během používání, i přes výrobcem deklarovaných 100 použití, jak upozorňuje článek Ichibangase *et al.* (2009). Jednalo se hlavně o rozdíly v oblasti haptoglobinu a imunoglobulinů.

Uváděných 5 proteinů bylo identifikováno jako feritin (SSP 4112), hemoglobin alfa (SSP 9002), hemoglobin beta (SSP 8402), kataláza (SSP 8404) a CO₂ anhydráza 1 (SSP 8101) (**Tab.8, Kap.5.3.1.2.**). Všechny uvedené bílkoviny jsou paradoxně zvýšeny u kontrolní skupiny, tedy po úspěšné transplantaci kostní dřeně.

Je známo, že ke změně hladin feritinu v lidském séru dochází při některých nádorových, hematologických a zánětlivých onemocněních. Navíc hladina feritinu v séru se v průběhu života mění, v dětství až do puberty jsou jeho hodnoty nízké. Zvýšená hladina feritinu zjištěná v této práci by mohla korelovat s podstoupenou léčbou, konkrétně s transfuzí krve, kterou dětští pacienti podstupují a která vede vysokému zatížení organismu železem (Eng a Fish 2011). Je tedy možné, že zvýšená koncentrace i dalších 4 výše uvedených proteinů je spíše důsledkem léčby ALL.

Poslední část pokusů ověřovala možnost, že některý z biomarkerů ALL je navázán na albumin. Albumin, jakožto majoritní bílkovina plazmy, je mimo jiné transportním proteinem mnoha látek (mastné kyseliny, aminokyseliny, hormony, ionty aj.), (Racek 1999). Vzhledem k této skutečnosti byla pomocí 2-DE analyzována i frakce vázaná na kolonky (**Obr.33, Kap.5.3.1.3.**).. Nicméně se ukázalo, že u porovnávaných proteomů nebyly zjištěny významné změny s ohledem na detekční limit metody.

Druhou technikou dovolující snížení komplexity vzorku byla technika frakcionace pomocí „**Zoom® IEF**“ frakcionátoru. Na principu negelové izoelektrické fokusace došlo k rozdělení vzorku do 4 dílčích frakcí. Výhodou bylo, že vzorek zůstal kompletní, při postupu nedocházelo k odstranění žádné frakce bílkovin.

Při hodnocení výsledných proteomů kostní plazmy bylo zjištěno, že celkové množství proteinů na gelech je velmi nízké a i při použití fluorescenčního barvení (SYPRO Ruby) nebyl výsledek pro analýzu dostatečný (**Obr.36; Kap.5.3.2.**). Ukázalo se, že při vlastním procesu frakcionace provedeném podle návodu, dojde k 10násobnému naředění vzorku. Nicméně i při následujícím srážení vzorku došlo k významným ztrátám proteinů, které nebylo možné kompenzovat. Možnost zvýšení koncentrace vzorku na počátku frakcionace by mohla vést k riziku zanesení membrán

mezi komůrkami, jejich následné neprůchodnosti a dalším doprovodným artefaktům, proto nebylo k tomuto kroku přistoupeno.

Metoda frakcionace umožňuje zacílit se na sledovanou skupinu proteinů, ale v případě použití pro kostní plazmu, kde byl hlavní cíl hledání minoritních proteinů, se ukázala jako nevyhovující. Z těchto důvodů bylo od metody upuštěno a snahy byly upřeny na „depleční“ postupy (viz výše). Nic to nemění na faktu, že byly získány užitečné zkušenosti při práci s frakcionátorem, které mohou být využity pro jiné účely, např. pro zvýšení celkového detegovatelného množství bílkovin u bakteriálních preparátů (Richardson *et al.* 2008), či pro lepší detekci hůře separovatelných bílkovin (Myung a Lubec 2006).

Závěrem lze říci, že se podařilo analyzovat proteomy dětských pacientů s ALL a kontrolní skupiny po úspěšné transplantaci kostní dřeně a byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami. Zvýšená koncentrace proteinu feritinu i katalázy u kontroly byla nezávisle potvrzena i spolupracující laboratoří (pomocí metody ELISA). Tato primární proteomová data dále poslouží jako významná část celého vědeckého projektu sledujícího „bílkoviny důležité u dětské ALL“.

6.4. Proteomický přístup v jednotlivých projektech

Jednotlivé části diskuze se zatím zabývaly více řešením biologické podstaty jednotlivých projektů. Nicméně velkou výhodou této práce je možnost analýzy a porovnání 2-DE metody ve zcela rozdílných vědeckých projektech. Proto následující část je věnována výčtu předností nebo naopak úskalí této technologie, se kterými se bylo možno setkat při práci na jednotlivých studiích.

Studie proteomů, za jasně definovaných fyziologických podmínek, umožňuje pochopení složitých biologických procesů v buňce a dovoluje usoudit na funkci neznámých proteinů, případně i posttranslační modifikace. Nicméně je podstatné, aby přístup k proteomice a díky ní získaným datům, byl uvažovaný. Je velmi důležité mít dostatek informací o fyziologii bakterie či buňky, získaných nezávislými experimenty, které následně lze konfrontovat se získanými daty z 2-DE.

Projekt sledující adaptaci *B. subtilis* na pH prostředí studoval změny v bakteriální kultuře, která neprocházela dlouhým vývojem. Tomu následně odpovídaly i výsledky analýzy stresového proteomu, kdy bylo detegováno 5 významných změn, které lze spojit s odpovědí organismu na daný stres. Naproti tomu ve srovnávací studii bílkovin kontinuálně kultivované *E. coli* se jednalo o populačně-biologický projekt.

Získané proteomy obsahovaly spektrum proteinů z daného času kontinuální kultivace z populace bakterií, která prošla dlouhým vývojem (desítky generací). Zjištěné významné změny se tedy týkaly vývoje populace a nepřekvapuje tedy velké množství odlišných proteinů (60) a jejich unikátnost pro jednotlivé fáze kultivace (pouze 4 proteiny se objevily ve více vzorcích současně). Zjištěné změny v syntéze proteinů, lze tak částečně interpretovat jen pomocí dalších experimentů sledujících fyziologii bakteriální populace v daném čase. Nicméně i tak zůstává velká skupina proteinů v souboru, u nichž interpretace jejich úlohy by byla nepřesná, případně až mylná. Navíc je nezbytné aby pro správnou interpretaci proteomových studií byla provedena analogická transkriptomová analýza a zejména pak sekvenace DNA. Ta by měla určit zda během dlouhého vývoje populace (více než 100 generací) došlo ke vzniku mutací, které jsou pak manifestovány variabilitou proteomu případně transkriptomu.

Problém s hledáním spojitosti identifikovaného proteinu se sledovanou situací je, z jiného úhlu pohledu, demonstrován i na projektu dětské akutní leukémie. Proteinové změny byly nalezeny převážně v kontrolní skupině, oproti očekávaným změnám u vzorků z nemocných. Na výsledku se projevil fakt, že byla k dispozici malá a navíc velmi heterogenní skupina testovaných pacientů. Závěry z experimentu opět ukazují na důležitost výběru a úpravy vstupního vzorku, který je separován a analyzován pomocí 2-DE, resp. na přesném definování toho, s čím dále pracujeme.

Navíc při jakékoliv proteomické studii je nutné mít na paměti proměnlivost proteinů v buňce v čase a prostoru, narozdíl od práce s genetickou informací. Je tedy zřejmé, že úzkostlivá péče při přípravě vzorků, se může bohatě vyplatit při hodnocení výsledných dat.

V poslední řadě je nutné zmínit i nezbytnost správného využití počítačových programů při analýze gelů (v této práci PDQuest 7.3.1.). Ty dovolují získaná data matematicky zpracovat a vytvořit detailní kvantitativní analýzy získaných proteomů. Ale podobně jako v předcházejících krocích je nutno být obezřetný při následném vyhodnocení gelů, protože i tento krok má své pozitivní a negativní stránky dle vybraného typu programu, s tím např. souvisí problematika „ztracených“ proteinů (Albrecht *et al.* 2010).

Tato práce se snažila ukázat mnohostrannost využití 2-DE metody jako rovnocenné součásti řady vědeckých projektů, její možnosti, výhody a také předvídatelné nedostatky, kterým je možné efektivně čelit.

7. ZÁVĚRY

7.1. Studium bakteriální membrány *Bacillus subtilis* vystaveného pH stresu

1. Bakterie *Bacillus subtilis* 168 trp₂⁻ roste v rozsahu vnějšího pH 5,0 – 8,5 s optimem v **pH 7,0** v komplexním mediu s 0,025 M fosfátovým pufrům (**T = 19 minut**). Při změně kultivačního pH media se doba zdvojení symetricky prodlužuje **u pH 5,0** na **T = 27 minut** a **T = 31 minut** pro **pH 8,5**.
2. Změny ve spektru membránových proteinů izolovaných z bakterií po dlouhodobé kultivaci při **pH 5,0** byly detegovány pomocí **2-D SDS-PAGE**. Tento vzorek byl porovnáván s kontrolní kultivací (pH 7,0), počítačově vyhodnocen a významné změny po pH stresu byly identifikovány MS MALDI-TOF.

Celkově bylo zjištěno 25 proteinových změn, z toho 5 významných:

- Syntéza 9krát zvýšena po pH stresu u proteinu č.1 (**AcoB**);
 - Syntéza 6krát zvýšena po pH stresu u proteinů č.3-5 (**SodA**, **YjeH** a **YwaC**);
 - Syntéza 2krát zvýšena po pH stresu u proteinu č.2 (**YkwC**).
3. Pulzní časově rozlišená fluorescenční spektroskopie poskytla fyzikálně-chemické údaje o cytoplazmatických membránách bakterií dlouhodobě kultivovaných v **pH 5,0** a **pH 8,5**:
 - **Střední doba života excitovaného stavu sondy DPH (τ)**. Cytoplazmatické membrány izolované z pH 5,0 vykazují nejnižší hodnotu τ . Se zvyšujícím se pH kultivace roste i doba života excitovaného stavu sondy. pH prostředí, ve kterém jsou jednotlivé vzorky měřeny, nemá na hodnoty τ významný vliv.
 - **Parametr uspořádanosti $\langle P_2 \rangle$** , který charakterizuje uspořádanost membrány, ukazuje, že membrány z pH 5,0 jsou nejspóřádanější a se zvyšujícím se pH kultivace uspořádanost klesá. Stejná závislost platí i pro pH měření. V cytoplazmatických membránách kultivovaných při pH 5,0 je pohyb sondy DPH omezený, naopak v alkalickém pH 8,5 je uspořádanost membrány menší.

7.2. Srovnávací proteomová studie adaptace populace *Escherichia coli* rezistentní k erytromycinu při kontinuální kultivaci

1. **Růst** *E. coli* probíhal kontinuálně v zařízení chemostat (nelimitovaný) po dobu 100-120 generací v přítomnosti subletální koncentrace antibiotika erytromycinu. Ve vybraných časech kultivace (**43 hod, 68 hod a 103 hod**) byly sledovány růstové a další fyziologické parametry.
 - **Doba zdvojení** se u kontrolní kultivace pohybovala kolem 60 min, ve 103. hod růstu došlo ke snížení na 53 min. U kultivace s erytromycinem kultura z maxima kolem 83 min (43 hod a 68 hod) zrychlí ve 103. hod až na 60 min.
 - **Syntéza** elongačního faktoru **EF-Tu** se v průběhu kultivace také mění, což úzce souvisí s rychlostí translace. U kultivace s antibiotikem je jeho syntéza v 68. hod až dvojnásobná ve srovnání s kontrolou. Ve 103. hodině se syntéza EF-Tu u obou experimentů srovnává.
 - Pomocí reportérového genu byla sledována **relativní přesnost translace**. U kontrolní kultivace došlo ve 103. hod k poklesu hodnoty Rlu/O.D., tedy vyšší přesnosti translace. Trend u kultivace s antibiotikem je opačný, přesnost translace se v čase snižuje, zvyšuje se poměr Rlu/O.D.
 - **Rezistence** bakterie *E. coli* k erytromycinu v průběhu kultivace byla studována na antibiotikových gradientových plotnách z jednotlivých časů odběrů. U bakterií z kontrolní kultivace je nárůst patrný do maximální koncentrace antibiotika 150 µg/ml ve všech časech. U kultury s erytromycinem se v průběhu kontinuální kultivace počet vysoce rezistentních kmenů dramaticky zvyšuje.
2. Srovnávací proteomovou **kvantitativní** analýzou byly srovnávány proteinové profily bakterie kultivované v přítomnosti či nepřítomnosti antibiotika erytromycinu v jednotlivých časech kontinuální kultivace. Výsledná analýza ukázala (syntéza u vybraných proteinů byla s faktorem 4, tj. 4krát vyšší či nižší), že:

- ve **43. hod** kultivace se mění syntéza u **29** bílkovin.
- v **68. hod** kultivace byly změny v syntéze u **9** bílkovin.
- ve **103. hod** kultivace byly změny v syntéze u **23** bílkovin.

Tyto proteiny byly následně identifikovány MS MALDI-TOF.

3. **Srovnávací proteomová kvalitativní analýza** ukázala pouze malé změny v proteinovém spektru. Tato analýza zahrnovala bílkoviny, které v jednom či více časech odběru chybí. Celkově se jednalo o 12 proteinových změn.

7.3. Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukémie

1. „Imunodeplece“ - systém ProteomeLab IgY-12:

- **Celkový proteinový profil kostní plazmy** (bez „deplece“) – celkově detegováno na gelech cca 260 spotů. Následnou srovnávací analýzou byly zjištěny změny v kvantitě u 7 proteinů: jeden protein jen u skupiny nemocných; 3 proteiny (faktor 4x); 3 proteiny (faktor 2x) u kontrolního vzorku. Tyto malé rozdíly vedly k využití „imunodeplečních“ postupům pro zvýšení citlivosti metody.
- **„Depletovaná“ frakce kostní plazmy** – po odstranění 12 majoritních bílkovin pomocí komerčně dostupné kolony („imunodeplece“ - systém ProteomeLab IgY-12. Zvýšení celkového počtu detegovaných spotů na gelu na cca **400**.
 - První série pokusů – změny: 1 protein unikátní pro kontrolní skupinu (SSP 3113), 6 proteinů zvýšeno v kontrole (faktor 4x) a 11 proteinových změn s faktorem 2x.
 - Druhá série – změny: 1 unikátní protein v kontrole (jiný než v I. sérii), 6 unikátních proteinů u skupiny nemocných, změny u 7 proteinů u nemocných (faktor 4x) a 24 změn s faktorem 2x, z toho 5 proteinů je zvýšeno v kontrole.
 - Průnik: 5 proteinových změn (i s ohledem na intenzitu jejich syntézy) - proteiny SSP 4112 (ferritin), 9002 (hemoglobin alfa), 8402 (hemoglobin beta), 8404 (kataláza), 8101 (CO₂ anhydráza 1).

- **Albuminová frakce kostní plazmy** – bílkoviny zachycené „imunodepleční“ kolonou, snaha vyloučit vazby jiného proteinu - *biomarkeru* ALL na albumin. Zjištěné změny: 2 bílkoviny – obě jsou nicméně součástí imunoglobulinové oblasti v gelu.
 - Tento typ oddělení majoritních bílkovin ze vzorku a jeho následná separace a analýza byla vyhovující.
- 2. „Pre-frakcionace“** - systém **ZOOM[®] IEF** Frakcionator (Invitrogen) – rozdělení vzorku do 4 frakcí na principu izoelektrické fokusace v roztoku frakce pH 3,0-5,4, pH 5,4-6,2, pH 6,2-7,0 a pH 7,0-10,0.
- Separace vzorku do jednotlivých frakcí proběhla v pořádku. Vzhledem k charakteru dílčích frakcí byla pozornost zaměřena na frakce **pH 5,4-6,2** a **6,2-7,0** (kyselá frakce obsahovala minimum bílkovin, bazická frakce byla špatně separovatelná).
 - Celkový počet detegovatelných spotů na jednotlivých gelech byl malý i přes použití fluorescenčního barvení (SYPRO Ruby). Během separace došlo k významným ztrátám (naředění vzorku během „pre-frakcionace“).
 - Tento typ separace vzorku byl pro naše účely zjištěn jako nevyhovující.

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Abdelwaheb C, Ahmed L. (2009): Acid pre-adaptation enhances virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* dam mutant. *Pathol. Biol. (Paris)* 57(5): 358-62.

Ahmed F.E. (2009): The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877(22): 1963-81.

Alaiya A.A., Franzen B., Auer G., Linder S. (2000): Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis* 21: 1210-1217.

Albrecht D., Kniemeyer O., Brakhage A.A., Guthke R. (2010): Missing values in gel-based proteomics. *Proteomics* 10(6): 1202-11.

Amoresano A., Carpentieri A., Giangrande C., Palmese A., Chiappetta G., Marino G., Pucci P. (2009): Technical advances in proteomics mass spectrometry: identification of post-translational modifications. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47(6): 647-65.

Andersson D.I., Andersson S.G., Kurland CG. (1986): Functional interactions between mutated forms of ribosomal proteins S4, S5 and S12. *Biochemie* 68(5): 705-13.

Anderson L., Anderson N.G. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5421–5425.

Anderson N.L., Anderson N.G.: (2002) The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 1: 845–867.

Anderson N.L., Polanski M., Pieper R., Gatlin T., Tirumalai R.S., Conrad T.P., Veenstra T.D., Adkins J.N., Pound J.G., Fagan R., Lobley A. (2004): The Human plasma Proteome: A Non-Redundant List Developed by Combination of Four Separate Sources. *Mol. Cell. Proteomics* 3: 311-26.

Anderson N.L., Anderson N. G. (1991): A two-dimensional gel database of human plasma proteins. *Electrophoresis* 12: 883–906.

Areekit S., Kanjanavas P., Khawsak P., Pakpitchareon A., Potivejkul K., Chansiri G., Chansiri K. (2011): Cloning, Expression, and Characterization of Thermotolerant Manganese Superoxide Dismutase from *Bacillus sp.* MHS47. *Int. J. Mol. Sci.* 12(1): 844-56.

Atalla A., Schumann W. (2003): The pst operon of *Bacillus subtilis* is specifically induced by alkali stress. *J. Bacteriol.* 185(16): 5019-22.

Barre O., Solioz M. (2006): Improved protocol for chromatofocusing on the ProteomeLab PF2D. *Proteomics* 6: 5096-5098.

Beechem J.M., Ameloot M., Brand L. (1985): Global and target analysis of complex decay phenomena. *Anal. Instrum.* 14: 379.

Berggren K., Chernokalskaya E., Steinberg T.H., Kemper C., Lopez M.F, Diwu Z., Haugland R.P., Patron W.F. (2000): Background-free, high sensitivity staining of proteins in

one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21: 2509–2521.

Berkelman T., Stenstedt T. (1998): 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients. Principles & Methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala.

Bernsel A., Daley D.O. (2009): Exploring the inner membrane proteome of *Escherichia coli*: which proteins are eluding detection and why? *Trends Microbiol.* 17(10): 444-9.

Bisschop A., Konings W.N. (1976): Reconstitution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity with manadione in membrane vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis* AroD. Relation between electron transfer and active transport. *Eur. J. Biochem.* 67: 357-365.

Bjellqvist B., Sanchez J.C., Pasquali C., Ravier F., Paquet N., Frutiger S., Hughes G.J., Hochstrasser D. (1993): Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* 14: 1375-1378.

Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996): Proteins methods, 2nd edition. Wiley- Liss, USA.

Bryson V., Szybalski W. (1952): Microbial selection. *Science* 116: 45-51.

Bunai K., Yamane K. (2005): Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 815(1-2): 227-36.

Buriánková K. (2003): Ribosomal resistance to macrolide antibiotics and their effect on translation accuracy, PříFUK v Praze a „Paris-Sud University“ v Orsay. Dizertační práce.

Büttner K., Bernhardt J., Scharf Ch., Schmidt R., Moder U., Eymann Ch., Antelmann H., Völker A., Völker U., Hecker M. (2001): A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 22: 2908–2935.

Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. (2004): Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327–1333.

Cao M., Kobel P.A., Morshedi M.M., Wu M.F., Paddon C., Helmann J.D. (2002): Defining the *Bacillus subtilis* sigma (W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J. Mol. Biol.* 316: 443-57.

Cao R., Li X., Liu Z., Peng X. Hu W., Wang X., Chen P., Xie J., Liang S. (2006): Integration of a twophase partition method into proteomics research on rat liver plasma membrane proteins. *J. Proteome Res.* 5: 634–642.

Card G.L. (1973): Metabolism of phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and cardiolipine of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 114: 1125-1137.

Carrascosa J.L., Llorca O., Valpuesta J.M. (2001): Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. *Micron* 32: 43–50.

- Cordwell S.J., Nouwens A.S., Verrills N.M., Basseal D.J., Walsh B.J. (2000):** Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* 21: 1094–1103.
- Dakna M., He Z., Yu W.C., Mischak H., Kolch W. (2009):** Technical, bioinformatical and statistical aspects of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) based clinical proteomics: a critical assessment. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877(13): 1250-1258.
- Daley D.O., Rapp M., Granseth E., Melén K., Drew D., von Heijne G. (2005):** Global Topology Analysis of the *Escherichia coli* Inner Membrane Proteome. *Science* 308: 1321-1323.
- Dykhuisen D.E., Hartl D.L. (1983):** Selection in chemostats. *Microbiol. Rev.* 47: 150-168.
- Egen N.B., Thormann W., Twitty G.E., Bier M. (1984):** A New Preparative Isoelectric Focusing Apparatus. *Electrophoresis* '83: 547–550.
- Elia G. (2008):** Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics* 8: 4012–4024.
- Eng J., Fish J.D. (2011):** Insidious iron burden in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 56(3): 368-71.
- Eymann C.H., Dreisbach A., Albrecht D., Bernhardt J., Becher D., Gentner S., Tam le T., Büttner K., Buurman G., Scharf Ch., Venz S., Völker U., Hecker M. (2004):** A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics* 4: 2849-76.
- Foster J.W. (1999):** When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 170-174.
- Foster J.W. (2000):** Microbial responses to acid stress: 99 – 115. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress response*. AMS Press. Washington D.C.
- Fountoulakis M., Takács M.F., Berndt P., Langen H., Takás B. (1999):** Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* 20(11): 2181-2195.
- Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., Lazarow P.B. (1982):** Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93: 97–102.
- Gerner C., Vejda S., Gelbmann D., Bayer E., Gotzmann J., Schulte-Hermann R., Mikulits W. (2002):** Concomitant determination of absolute values of cellular protein amounts, synthesis rates, and turnover rates by quantitative proteome profiling. *Mol. Cell. Proteomics*. 1: 528-537.
- Gharahdaghi F., Weinberg C.R., Meagher D.A., Imai B.S., Mische S.M. (1999):** Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20: 601-605.
- Gloriam, D., Foord, S., Blaney, F., Garland, S. (2009):** Definition of the G protein-coupled receptor transmembrane bundle binding pocket and calculation of receptor similarities for drug design. *J. Med. Chem.* 52: 4429–4442.

- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. (2000):** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W. (1999):** Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20: 712-717.
- Görg A., Postel W., Weser J., Gunther S., Strahler J.R., Hanash S. M., Somerlot L. (1987):** Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8: 122-124.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. (2004):** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Grau R., Gardiol D., Gilkin G.C., Mendoza D. (1994):** DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 11: 933-941.
- Graumann P., Schröder K., Schmid R., Marahiel M.A. (1996):** Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178: 4611 – 4619.
- Grundy F.J., Waters D.A., Allen S.H., Henkin T.M. (1993):** Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J. Bacteriol.* 175: 7348-7355.
- Guillonneau F., Labas V., Auvin C., Praseuth D. (2001):** A reliable and simple method for two-dimensional electrophoresis and identification of HeLa nuclear alkaline nucleic acid-binding proteins using immobilized pH gradient. *Electrophoresis* 22: 4391–4403.
- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. (1999):** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17: 994-999.
- Hájková Z. (2007):** Diplomová práce, PřF UK Praha.
- Halai, R., Craik, D. J. (2009):** Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26: 526–536.
- Han M.J., Lee S.Y. (2006):** The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(2): 362-439.
- Hanash S.M., Madoz-Gurpide J., Misek D.E. (2002):** Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics. *Leukemia* 16: 478-485.
- Harder A., Wildgruber R., Nawrocki A., Fey S.J., Larsen P.M., Görg A. (1999):** Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 826-829.
- Harrison H., Miller K., Ober C., Refetoff S., Dick M., Elias S. (1991):** Identification of a serum protein polymorphism via two-dimensional electrophoresis. Family and population studies in two genetically isolated groups: North American Hutterites and Australian aborigines. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 362–369.
- Harwood C.R., Archibald A.R. (1990):** Growth, maintenance and general techniques p. 1-26. In Harwood C. R., Cutting S. M. (eds), *Molecular biological methods for Bacillus*. J. Wiley & Sons Ltd., England.

Hecker M., Völker U. (2001): General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. Adv. Microb. Physiol. 44: 35-91.

Henry H., Tissot J.D., Messerli B., Markert M., Muntau A., Skladal D., Sperl W., Jaeken J., Weidinger S., Heyne K., Bachmann C. (1997): Microheterogeneity of serum glycoproteins and their liver precursors in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I: apparent deficiencies in clusterin and serum amyloid P. J. Lab. Clin. Med. 129: 412–421.

Hensyl W.R. (1994): Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Herbert B. R., Molloy M.P., Gooley A.A., Walsh B.J., Bryson W.G., Williams K.L. (1998): Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. Electrophoresis 19: 845-851.

Herendeen S.L., van Bogelen R.A., Neidhardt F.C. (1979): Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. J. Bacteriol. 139: 185-194.

Heřman P. (1988): GLOBAL FIT – uživatelský popis programu. Interní publikace MFF UK, Praha.

Heřman P., Konopásek I., Plášek J., Svobodová J. (1994): Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes. Biochem. Biophys. Acta 1190: 1-8.

Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A. (2005): Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 55: 1113–1126.

Hirose I., Sano K., Shioda I., Kumano M., Nakamura K., Yamane K. (2000): Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. Microbiology 146: 65-75.

Holtmann G., Bremer E. (2004): Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. J. Bacteriol. 186: 1683-1693.

Hoskisson P.A., Hobbs G. (2005): Continuous culture – making a comeback? Microbiology 151: 3153–3159.

Hu L., Ye M., Zou H. (2009): Recent advances in mass spectrometry-based peptidome analysis. Expert Rev. Proteomics 6: 433-47.

Hughes G.J., Frutiger S., Paquet N., Ravier F., Pasquali C., Sanchez J.C., James R., Tissot J.D., Bjellqvist B., Hochstrasser D.F. (1992): Plasma protein map: an update by microsequencing. Electrophoresis 13: 707–714.

Humphery-Smith I., Cordwell S.J., Blackstock W.P. (1997): Proteome research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. Electrophoresis 18: 1217-1242.

Hutter G., Letsch A., Nowak D., Poland J., Sinha P., Thiel E., Hofmann W.K. (2009): High correlation of the proteome patterns in bone marrow and peripheral blood blast cells in patients with acute myeloid leukemia. J. Trans. Med. 7: 7.

- Chang P.S., Absood A., Linderman J.J., Omann G.M. (2004):** Magnetic bead isolation of neutrophil plasma membranes and quantification of membrane-associated guanine nucleotide binding proteins. *Anal. Biochem.* 325: 175–184.
- Chen J.L., Chiang M.L., Chou C.C. (2009):** Survival of the acid-adapted *Bacillus cereus* in acidic environments. *Int J Food Microbiol* 128: 424–428.
- Chen R., Jiang X., Sun D., Han G., Wang F., Ye M., Wang L., Zou H. (2009):** Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J. Proteome Res.* 8: 651–661.
- Chevallet M., Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S., Rossignol M., Lunardi J., Garin J., Rabilloud T. (1998):** New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 1901–1909.
- Ichibangase T., Moriya K., Koike K., Imai K. (2009):** Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr.* 23(5):480–7.
- Inaoka T., Matsumura Y., Tsuchido T. (1998):** Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 3697–3703.
- Inaoka T., Matsumura Y., Tsuchido T. (1999):** SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 1939–1943.
- Issaq H.J., Veenstra T.D. (2007):** The role of electrophoresis in disease biomarker discovery. *Electrophoresis* 28: 1980–1988.
- Ito C., Kumagai M., Manabe A., Coustan-Smith E., Raimondi S.C., Behm F.G., Murti K.G., Rubnitz J.E., Pui C.H., Campana D. (1999):** Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood* 93: 315–320.
- Iversen P.O., Wiig H. (2005):** Tumor necrosis factor alpha and adiponectin in bone marrow interstitial fluid from patients with acute myeloid leukemia inhibit normal hematopoiesis. *Clin. Cancer Res.* 11: 6793–6799.
- Iwade Y. (2008):** Clinical Proteomics in Cancer Research—Promises and Limitations of Current Two-Dimensional Gel Electrophoresis, *Curr. Med. Chem.* 15: 2393–2400.
- Josic D., Brown M.K., Huang F., Callanan H., Rucević M., Nicoletti A., Clifton J., Hixson D.C. (2005):** Use of selective extraction and fast chromatographic separation combined with electrophoretic methods for mapping of membrane proteins. *Electrophoresis* 26: 2809–2822.
- Kabbani N. (2008):** Proteomics of membrane receptors and signaling. *Proteomics* 8: 4146–4155.
- Keil B., Šormová Z. (1959):** Laboratorní technika biochemie. ČSAV, Praha.
- Kinosita K., Jr, Kawato S., Ikegami A. (1977):** A theory of fluorescence polarization decay in membranes. *Biophys. J.* 20: 289–305.

- Klose J. (1975):** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26(3):231-43.
- Kolkman A., Olsthoorn M.M., Heeremans C.E., Heck A.J., Slijper M. (2004):** Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol. *Mol. Cell. Proteomics* 4: 1–11.
- Konopásek I. (1992):** Kandidátská dizertační práce. PřF UK Praha.
- Konopásek I., Strzalka K., Svobodová J. (2000):** Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* 1464 (1):18-26.
- Koshland D. E., Jr. (1993):** Molecule of the year. *Science* 262: 1953.
- Krulwich T.A., Agus R., Schneier M., Guffanti A.A. (1985):** Buffering capacity of bacilli that grow at different pH ranges. *J. Bacteriol.* 162: 768-772.
- Kullolli M., Hancock W. S., Hincapie M. (2008):** Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. *J. Sep. Sci.* 31: 2733–2739.
- Laemmli U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.
- Lakowicz J.R. (1983):** Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Langen H., Berndt P.: Proteome Research: Mass Spectrometry** (James P., ed.). Springer, Berlin 2001.
- Lawson E.L., Clifton J.G., Huang F., Li X., Hixson D.C., Josic D. (2006):** Use of magnetic beads with immobilized monoclonal antibodies for isolation of highly pure plasma membranes. *Electrophoresis* 27: 2747–2758.
- Lee H.H., Molla M.N., Cantor Ch.R., Collins J.J. (2010):** Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467: 82-85.
- Lee J.H., Lee J. (2010):** Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 426–444.
- Lentz B.R. (1989):** Membrane „fluidity“ as detected by diphenylhexatriene probes. *Chem. Phys. Lipids* 50: 171-190.
- Levreri I., Musante L., Petretto A., Bruschi M., Candiano G., Melioli G. (2005):** Separation of human serum proteins using the Beckman-Coulter PF2D system: analysis of ion exchange-based first dimension chromatography. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43: 1327-1333.
- Link A.J. (ed.):** 2-D Proteome Analysis Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, sv.112. Humana Press, Totowa 1999.
- Luche S., Santoni V., Rabilloud T. (2003):** Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3: 249–253.

Maisnar V., Tichý M., Stulík J., Urban P., Adam Z., Kadlčková E., Vávrová J., Palička V., Jebavý L., Kodet R., Buchler T., Hájek R. (2008): Capillary immunotyping electrophoresis and high resolution two-dimensional electrophoresis for the detection of mu-heavy chain disease. *Clin. Chim. Acta* 389: 171-173.

Maruyama T., Tanaka S., Shimada A., Funae O. Kasuga A., Kanatsuka A., Takei I., Yamada S., Harii N., Shimura H., Kobayashi T. (2008): Insulin intervention in slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 2115–2121.

Matsui N.M., Smith-Beckerman D.M., Epstein L.B.: 2-D Proteome Analysis Protocols, Series: Methods in Molecular Biology (kniha, Link A. J., ed.), sv. 112, kap. 34. Humana Press, Totowa 1999.

McDonough J., Marban E. (2005): Optimization of IPG strip equilibration for the basic membrane protein mABC1. *Proteomics* 5: 2892–2895.

Miethke M., Hecker M., Gerth U.J. (2006): Involvement of *Bacillus subtilis* ClpE in CtsR degradation and protein quality control. *J.Bacteriol.* 188: 4610-9.

Mikulík K., Bobek J., Ziková A., Smětáková M., Bezoušková S. (2011): Phosphorylation of ribosomal proteins influences subunit association and translation of poly (U) in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Biosyst.* 7(3): 817-23.

Miura K. (2001): Imaging and detection technologies for image analysis in electrophoresis *Electrophoresis* 22: 801-813.

Molloy M.P., Herbert B.R., Walsh B.J., Tyler M.I., Traini M., Sanchez J.C., Hochstrasser D.F., Williams K.L., Gooley A.A. (1998): Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 837-44.

Musante L., Candiano G., Ghiggeri G.M. (1998): Resolution of fibronectin and other uncharacterized proteins by two-dimensional polyacrylamide electrophoresis with thiourea. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 705: 351–356.

Myung J.K., Lubec G. (2006): Use of solution-IEF-fractionation leads to separation of 2673 mouse brain proteins including 255 hydrophobic structures. *J. Proteome Res.* 5(5):1267-75.

Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.

Neuhoff V., Stamm R., Eibl H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6(9): 427-448.

Nishigaki H., Ito C., Manabe A., Kumagai M., Coustan-Smith E., Yanishevski Y., Behm F.G., Raimondi S.C., Pui C.H., Campana D. (1997): Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89: 3735-3744.

Nishii K., Katayama N., Miwa H., Shikami M., Masuya M., Shiku H., Kita K. (1999): Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *Br. J. Haematol.* 105: 701-710.

- Normark S., Boman H.G., Matsson E. (1969):** Mutant of *Escherichia coli* with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. *J. Bacteriol.* 97: 1334-42
- Novick A., Szilard L. (1950):** Description of the Chemostat. *Science* 112: 715-716.
- O'Farrell P.H. (1975):** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10): 4007-21.
- O'Farrell P.Z., Goodman H.M., O'Farrell P.H. (1977):** High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
- O'Connor M., Gregory S.T., Dahlberg A.E. (2004):** Multiple defects in translation associated with altered ribosomal protein L4. *Nucleic Acids Res.* 32: 5750-5756.
- Ogle J.M., Ramakrishnan V. (2005):** Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 74:129-177.
- Padan E., Bibi E., Ito M., Krulwich T.A. (2005):** Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1717: 67-88.
- Pan J.Y., Wu H., Liu X., Li P.P., Li H., Wang S.Y., Peng X.X. (2011):** Complexome of *Escherichia coli* cytosolic proteins under normal native conditions. *Mol. Biosyst.* (v tisku).
- Patton W.F. (2000):** A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* 21: 1123-1144.
- Periago P.M., van Schaik W., Abee T., Wouters J.A. (2002):** Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3486-3495.
- Petráčková D. (2001):** Adaptace cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* 168 trp₂- na pH prostředí; diplomová práce, PřF UK Praha.
- Petráčková D. (2003):** Adaptace bakteriální membrány *Bacillus subtilis* na pH stres; rigorózní práce, PřF UK Praha.
- Petráčková D., Šemberová L., Halada P., Svoboda P., Svobodová J. (2010):** Stress proteins in the cytoplasmic membrane fraction of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 55(5):427-34.
- Petráčková D., Večeř J., Svobodová J., Heřman P. (2010):** Long-term adaptation of *Bacillus subtilis* 168 to extreme pH affects chemical and physical properties of the cellular membrane. *J. Membr. Biol.* 233(1-3):73-83.
- Piper M.D., Daran-Lapujade P., Bro C., Regenber B., Knudsen S., Nielsen J., Pronk J.T. (2002):** Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses. An interlaboratory comparison using chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277: 37001-37008.
- Polyakova O.V., Roitel O., Asryants R.A., Poliakov A.A., Branlant G., Muronetz V.I. (2005):** Misfolded forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with GroEL and inhibit chaperonin-assisted folding of the wild-type enzyme. *Protein Science* 14: 921-928.

- Pui C.H., Robison L.L., Look A.T. (2008):** Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371: 1030-1043.
- Qian W.J., Jacobs J.M., Liu T., Camp D.G., 2nd, Smith R.D. (2006):** Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profilig for clinical applications. *Mol. Cell. Proteomics* 5: 1727-1744.
- Rabilloud T. (1990):** Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11: 785-794.
- Rabilloud T. (1992):** A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* 13(7):429-39.
- Rabilloud T. (1996):** Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. *Electrophoresis* 17: 813-829.
- Rabilloud T. (1998):** Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 758-60.
- Rabilloud T. (2002):** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2: 3-10.
- Rabilloud T. (ed.):** Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer, Berlin 2000.
- Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. (1997):** Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18: 307-16.
- Rabilloud T., Valette C., Lawrence J.J. (1994):** Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 15: 1552-1558.
- Rabilloud T., Vuillrd L., Gilly C., Lawrence J.J. (1994):** Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 40: 57-75.
- Racek J. et al. (1999):** Klinická biochemie, Galén, 1. vydání.
- Reddy G., Dalmaso E.A. (2003):** SELDI ProteinChip technology: protein-based predictive medicine and drug discovery applications. *J. Biomed. Biotechnol.* 4: 237-241.
- Rees-Unwin K.S., Morgan G.J., Davies F.E. (2004):** Proteomics and the haematologist. *Clin. Lab. Haematol.* 26: 77-86.
- Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A. (2006):** Protein biomarker discovery and validation: the longand uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 24: 971–983.
- Righetti P.G., Castagna A., Antonioli P., Boschetti E. (2005):** Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* 26: 297–319.
- Richard H., Foster J.W. (2007):** Sodium regulates *Escherichia coli* acid resistance, and influences GadX- and GadW-dependent activation of gadE. *Microbiology* 153:3154-61.

- Richardson M.R., Liu S., Ringham H.N., Chan V., Witzmann F.A. (2008):** Sample complexity reduction for two-dimensional electrophoresis using solution isoelectric focusing prefractionation. *Electrophoresis* 29(12):2637-44.
- Rodriguez-Ortega M.J., Norais N., Bensi G., Liberatori S., Capo S., Mora M., Scarselli M., Doro F., Ferrari G., Garaguso I., Maggi T., Neumann A., Covre A., Telford J.L., Grandi G. (2006):** Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat. Biotechnol.* 24: 191–197.
- Roy I., Mondal K., Gupta M.N. (2007):** Leveraging protein purification strategies in proteomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 849: 32–42.
- Seferovic M.D., Krugikov V., Pinto D., Han V.K.M., Gupta M.B. (2008):** Quantitative 2-D gel electrophoresis-based expression proteomics of albumin and IgG immunodepleted plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 865: 147-152.
- Seshi B. (2007):** Proteomics strategy based on liquid-phase IEF and 2-D DIGE: application to bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Proteomics* 7: 1984-1999.
- Sheng S., Chen D., Van Eyk J.E. (2006):** Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome: optimization and protein database. *Mol. Cell Proteomics* 5: 26-34.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996):** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Shinitzki M., Barenholz Y. (1974):** Dynamic of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing diacetylphosphate. *J. Biol. Chem.* 249: 2652-2657.
- Shinitzki M., Barenholz Y. (1978):** Fluidity parametrs of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochem. Biophys. Acta* 515: 367-394.
- Schindler J., Lewandrowski U., Sickmann A., Friauf E., Nothwang H. G. (2006):** Proteomic analysis of brain plasma membranes isolated by affinity two-phase partitioning. *Mol. Cell Proteomics* 5: 390–400.
- Schultz K.R., Pullen D.J., Sather H.N., Shuster J.J., Devidas M., Borowitz M.J., Carroll A.J., Heerema N.A., Rubnitz J.E., Loh M.L., Raetz E.A., Winick N.J., Hunger S.P., Carroll W.L., Gaynon P.S., Camitta B.M. (2007):** Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 109: 926-935.
- Singer S.J., Nicholson G.L. (1972):** The fluid mosaic model of the strukture of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Smejkal G.B., Robinson M. H., Lazarev A. (2004):** Comparison of fluorescent stains: relative photostability and differential staining of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis* 25: 2511-2519.
- Spisak S., Tulassay Z., Molnar B., Guttman A.: (2007)** Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery. *Electrophoresis* 28: 4261-4273.
- Srivastava R., Pisareva T., Norling B. (2005):** Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* 5: 4905–4916.

- Stasyk T., Huber L.A. (2004)** Zooming in: fractionation strategie in proteomics. *Proteomics* 4: 3704–3716.
- Stuhler K., Meyer H.E. (2004)**: MALDI: more than peptide mass fingerprints. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6(3): 239–48.
- Svobodová J., Julák J., Pilař J., Svoboda P. (1988)**: Membrane fluidity in *Bacillus subtilis*. Validity of homeoviscous adaptation. *Folia Microbiol.* 33(3):170–7.
- Šemberová L. (2002)**: Adaptace bakteriální membrány *Bacillus subtilis* na detergenty; diplomová práce, PřF UK Praha.
- Šíp M., Heřman P., Štěpánek J., Jelínek O. (1988)**: Systém pro impulsní fluorescenční spektroskopii s vysokým časovým rozlišením. *Čs. Časopis pro fyziku (sekce A)* 38: 380–390.
- Thingholm T.E., Larsen M.R., Ingrell C.R., Kassem M., Jensen O.N. (2008)**: TiO₂-based phosphoproteomic analysis of the plasma membrane and the effects of phosphatase inhibitor treatment. *J. Proteome Res.* 7: 3304–3313.
- Thomassin S., Jobin M-P., Schmitt P. (2006)**: The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate, and intracellular pH. *Arch Microbiol* 186: 229–239.
- Tjalsma H., Lambooy L., Hermans P.W., Swinkels D.W. (2008)**: Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. *Proteomics* 8: 1415–1428.
- Topiol S., Sabio M. (2009)**: X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochem. Pharmacol.* 78: 11–20.
- Toptygin D.D., Svobodová J., Konopásek I., Brand L. (1992)**: Fluorescence decay and depolarization in membranes, *J. Chem. Phys.* 96 (11): 7919 – 7930.
- Ünlü M., Morgan M.E., Minden J.S. (1997)**: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in cell extracts. *Electrophoresis* 18: 2071–2077.
- Van der Meer B.W., Pottel H., Herreman W., Ameloot M., Hendrickx H., Schröder H. (1984)**: Effect of orientational order on the decay of the fluorescence anisotropy in membrane suspension. *Biophys. J.* 15: 35–45.
- Van Duy N., Mäder U., Tran N.P., Cavin J-F., Tam L.T., Albrecht D., Hecker M., Antelmann H. (2007)**: The proteome and transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* in response to salicylic acid. *Proteomics* 7: 698–710.
- van Schaik W., Tempelaars M.H., Wouters J.A., de Vos W.M., Abee T. (2004)**: The alternative sigma factor sigmaB of *Bacillus cereus*: response to stress and role in heat adaptation. *J. Bacteriol.* 186: 316–25.
- VanBogelen R.A., Greis K.D., Blumenthal R.M., Tani T.H., Matthews R.G. (1999)**: Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends Microbiol.* 7(8): 320–8.
- VanBogelen R.A., Kelley P.M., Neidhardt F.C. (1987)**: Differential induction of heat shock, SOS and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 26–32.

- Vester B., Douthwaite S. (2001):** Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemothe.* 45: 1-12.
- Visick J.E., Clarke S. (1995):** Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* 16: 835-845.
- Walker A.K., Rymar G., Andrews P.C. (2001):** Mass spectrometric imaging of immobilized pH gradient gels and creation of "virtual" two-dimensional gels. *Electrophoresis* 22: 933-945.
- Washburn M.P., Yates J.R., 3rd (2000):** Analysis of the microbial proteome. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 292-297.
- Weerasekera R., She Y. M., Markham K.A., Bai Y., Opalka N., Orlicky S., Sicheri F., Kislinger T., Schmitt-Ulms G. (2007):** Interactome and interface protocol (2IP): a novel strategy for high sensitivity topology mapping of protein complexes. *Proteomics* 7: 3835–3852.
- Weisblum B. (1995):** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemothe.* 39: 577-585.
- Weiser J., Holub M., Nezbedova S., Bezouskova S. (2005):** Proteomics represents complex approach in studies of regulation of bacterial physiology. *Chemické Listy* 99: 890-895.
- Weiss W., Görg A. (2008):** Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 424: 35-42.
- Westermeier R. (2006):** Sensitive, Quantitative, and Fast Modifications for Coomassie Blue Staining of Polyacrylamide Gels. *Proteomics* 6: 61-64.
- Westermeier R., Schickle H. (2009):** The current state of the art in high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Arch. Physiol. Biochem.* 115(5): 279-85.
- White M.Y., Cordwell S.J. (2005)** in *Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics*, D.Garfin and S. Ahuja, Eds. (Elsevier Academic Press, Amsterdam), str.: 247–264.
- Wick L.M., Quadroni M., Egli T. (2001):** Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucoselimited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environ. Microbiol.* 3: 588–599.
- Wiegert T., Homuth G., Vesteg S., Schumann W. (2001):** Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* W regulon. *Mol. Microbiol.*: 41: 59.
- Wilks J.C., Kitko R.D., Cleeton S.H., Lee G.E., Ugwu C.S., Jones B.D., BonDurant S.S., Slonczewski J.L. (2009):** Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 981–990.
- Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H., Dunn M.J. (2000):** A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21: 3666-3672.
- Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. (2009):** Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed Eng.* 11: 49-79.
- Youk H., van Oudenaarden A. (2010):** Microbiology: Altruistic defence. *Nature* 467: 34-35.

- Zelent A., Greaves M., Enver T. (2004):** Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 23: 4275–4283.
- Zhang H., Li X.J., Martin D.B., Aebersold R. (2003):** Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 21: 660–666.
- Zhang L., Wang X., Peng X., Wei Y., Cao R., Liu Z., Xiong J., Ying X., Chen P., Liang S. (2007):** Immunoaffinity purification of plasma membrane with secondary antibody superparamagnetic beads for proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 6: 34–43.
- Zhang L., Xie J., Wang X., Liu X., Tang X., Cao R., Hu W., Nie S., Fan Ch., Liang S. (2005):** Proteomic analysis of mouse liver plasma membranes: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics* 5: 4510–4524.
- Zhang W., Zhou G., Zhao Y., White M.A., Zhao Y. (2003):** Affinity enrichment of plasma membrane for proteomics analysis. *Electrophoresis* 24: 2855–2863.
- Zhao Y., Zhang W., Kho Y., Zhao Y. (2004):** Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal. Chem.* 76: 1817–1823.
- Zhou S., Bailey M.J., Dunn M.J., Preedy V.R., Emery P.W. (2005):** A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics* 5: 2739–2747.
- Zilberstein G., Korol L., Bukshpan S., Baskin E. (2004):** Parallel isoelectric focusing chip. *Proteomics* 4: 2533–2540.
- Zilberstein G.V., Baskin E.M., Bukshpan S., Korol L.E. (2004):** Parallel isoelectric focusing II. *Electrophoresis* 25: 3643–3651.
- Zolotarjova N., Martosella J., Nicol G., Bailey J., Boyes B.E., Barrett W.C. (2005):** Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics* 5: 3304–3313.
- Zuo X., Speicher D. (2000):** A method for global analysis for complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.* 284: 266–278.